UNTERSUCHUNG VON METHOXYFLURAN AUF RADIKALBILDENDE EIGENSCHAFTEN IN VIVO

Carlheinz Wiedemann

1983

Aus dem Institut für
Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Angefertigt unter Leitung von Prof. Dr. A. Schmid

UNTERSUCHUNG VON METHOXYFLURAN

AUF RADIKALBILDENDE EIGENSCHAFTEN IN VIVO

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Carlheinz Wiedemann
aus
Stuttgart

München 1983

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. G. Terplan

Referent: Prof. Dr. A. Schmid

Korreferent: Prof. Dr. Dr. habil. U. Matis

Tag der Promotion: 25. Februar 1983

UNIV. LEIDEN BIBL.

Christoph & Michael
HOFBAUER
drucken + binden
Adalbertstrasse 18
8000 München 40

Meinen Eltern

sowie für

Rotraud mit Eltern

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544308_0029

INHALTSVERZEICHNIS Seite

I EINLEITUNG 1

II LITERATURÜBERSICHT 3

1 Chemische Radikale und ihre toxikologische Bedeutung 3

1.1 Definition und Eigenschaften 3

1.2 Toxikologische Bedeutung chemischer Radikale 4

1.2.1 Radikalwirkungen in vivo 4

1.2.2 Radikalwirkungen auf Membranlipide 4

1.2.2.1 Lipidperoxidation in vivo und Folgereaktionen 4

1.2.2.2 Zytopathologische Bedeutung der Lipidperoxidation 6

2 Nachweis von Radikalen und radikalinduzierter Lipidperoxidation 9

2.1 Nachweismethoden in vitro 9

2.2 Nachweismethoden in vivo 10

3 Radikalbildung 12

3.1 Spontane Radikalbildung 12

3.2 Metabolische Radikalbildung 12

3.2.1 Bedeutung des Fremdstoffmetabolismus 12

3.2.2 Mischfunktionelle Oxygenasen (MFO) 13

3.2.3 Radikalbildung durch die MFO 15

4 Methoxyfluran 16

4.1 Bedeutung und Verwendung 16

4.2 Chemische und physikalische Eigenschaften 17

4.3 Stoffwechselverhalten 18

4.3.1 Resorption 18

4.3.2 Endogene Verteilung 19

4.3.3 Metabolisierung 19

4.3.4 Ausscheidung 23

4.4 Pharmakologische Eigenschaften 24

4.4.1 Klinisches Wirkungsbild 24

Seite

4.4.2 Pathologische Methoxyfluranwirkungen 25
4.4.2.1 Nephrotoxizität 25
4.4.2.2 Hepatotoxizität 28
4.4.2.3 Mutagenität, Kanzerogenität, Teratogenität 30

III EIGENE UNTERSUCHUNGEN 32
1 Experimentelle Problemstellung 32
2 Versuchsplan 32
3 Versuchstiere, Versuchstierhaltung und -fütterung 33
4 Untersuchungsmethodik 36
4.1 Chemikalien und Gase 36
4.2 Versuchsdurchführung 37
4.2.1 Applikation und Dosierung der Wirkstoffe 37
4.2.2 Gewinnung der Exspirationsluft und der Leberproben 37
4.2.3 Kohlenwasserstoffbestimmung 38
4.2.4 Malondialdehydbestimmung 39
5 Versuchsauswertung 39
5.1 Kohlenwasserstoffberechnung 40
5.2 Malondialdehydberechnung 43
5.3 Statistische Beurteilung 44
5.3.1 Flächenberechnung 44
5.3.2 Flächenvergleich und statistische Beurteilung 45
6 Ergebnisse 46
6.1 Blindversuche ohne Versuchstiere 46
6.1.1 Blindversuch mit Referenzgasen in synthetischer Luft 46
6.1.2 Blindversuch mit Methoxyfluran in synthetischer Luft 47
6.2 Kontrollversuche mit Versuchstieren 48
6.2.1 Kontrollversuche in synthetischer Luft 48

Seite

6.2.2 Kontrollversuche in synthetischer Luft mit verschiedenem Sauerstoffgehalt 49
6.3 Testversuche mit Versuchstieren 50
6.3.1 Testversuche in synthetischer Luft 50
6.3.1.1 Testversuche mit nicht vorbehandelten Versuchstieren 50
6.3.1.2 Testversuche mit Phenobarbital-vorbehandelten Versuchstieren 52
6.3.1.3 Testversuche mit Piperonylbutoxid-vorbehandelten Versuchstieren 54
6.3.2 Testversuche in synthetischer Luft mit verschiedenem Sauerstoffgehalt 58

IV DISKUSSION 60
1 Untersuchungsmethode 60
2 Ergebnisse 61
3 Schlußfolgerungen 64

V ZUSAMMENFASSUNG 65

VI SUMMARY 66

VII LITERATURVERZEICHNIS 67

I EINLEITUNG

Die metabolische Entstehung von chemischen Radikalen aus Arzneistoffen und Giften stellt einen wichtigen, bislang wenig beachteten pharmakologisch-toxikologischen Wirkungsmechanismus dar (Schmid, 1982 a). Seine Bedeutung ist erst in neuerer Zeit mit der Möglichkeit, freie Radikale i n v i v o nachzuweisen, erkannt worden (Riely et al., 1974; Dillard et al., 1976; Cohen, 1979).

Da Radikale in der Regel außerordentlich reaktionsfähig und darüber hinaus starke Oxidationsmittel sind (Schmid, 1982 a), ist zu erwarten, daß ihre Bildung in vivo zu einer Schädigung von Lipiden, Proteinen, Nucleinsäuren und sonstigen oxidationsempfindlichen Strukturen führt (Übersicht bei Zimmermann, 1982), d. h., daß freie Radikale von ätiologischer Bedeutung für viele Krankheitszustände sind (Demopoulos, 1973 a). Es hat sich gezeigt, daß das sowohl für radikalinduzierte Schwermetalle (Übersicht bei Beuter, 1982 a; Schmid und Christoph, 1980) als auch organische Schadstoffe (Übersicht bei Schmid, 1982 a) zutrifft.

M e t h o x y f l u r a n ist ein Inhalationsanästhetikum, das in der Tiermedizin - im Gegensatz zur Humanmedizin (Van Dyke, 1981) - häufig verwendet wird (Buntenkötter, 1979; Brunson et al., 1979; Ward und Byland, 1982). Es handelt sich um einen Halogen-Kohlenwasserstoff, der im tierischen Organismus zu 50 bis 70 % einer resorbierten Dosis metabolisiert wird (Marshall und Wollman, 1980) und sich darüber hinaus im Fettgewebe anreichert (Herstellerangabe). Seine klinische Anwendung kann u. a. durch eine Leber- und/oder Nierenschädigung kompliziert sein (Elkington et al., 1968; Kalkay, 1977; Ndiritu und Weigel, 1977).

Diese Eigenschaften (chemische Struktur, Stoffwechselverhalten, Nebenwirkungen) sind mit der Hypothese vereinbar bzw. erklärbar, daß Methoxyfluran zu radikalischen Metaboliten biotransformiert wird (Recknagel et al., 1977 a; Schmid, 1982 b).

Ihre Überprüfung ist sowohl in Hinblick auf den Stoff selbst als auch hinsichtlich der pharmakologisch-toxikologischen Beurteilung strukturanaloger Arzneistoffe und Gifte von Bedeutung.

In der vorliegenden Arbeit ist daher experimentell untersucht worden, ob Methoxyfluran i n v i v o zu Radikalen umgesetzt wird.

II LITERATURÜBERSICHT

1 Chemische Radikale und ihre toxikologische Bedeutung

1.1 Definition und Eigenschaften

Das chemische Radikal ist definiert als ein - elektrisch neutrales, positiv oder negativ geladenes - Atom oder Molekül mit wenigstens einem unpaarigen Valenzelektron: $R^{\bullet}$, $R^{\bullet+}$ oder $R^{\bullet-}$ (Pryor, 1966; Demopoulos, 1973 b).

Aufgrund ihres Elektronenmangels wirken Radikale oxidierend, sind meist sehr reaktionsfähig und infolgedessen kurzlebig (Pryor, 1966; Schmid, 1982 a).

Radikalreaktionen sind im allgemeinen Kettenreaktionen, deren Ablauf man mit Pryor (1966 und 1973) in drei Phasen gliedern kann (siehe Tabelle 1).

Tab. 1: Phasen der radikalischen Kettenreaktion (Pryor, 1966 und 1973)

Phase	Reaktionstyp	Beispiel
Initiation	Radikalbildung	siehe Abschnitt 3
Propagation (Radikalverbreitung)	Radikalübertragung	Wasserstofftransfer: $R_1^{\bullet} + R_2H \rightarrow R_1H + R_2^{\bullet}$
	Addition	Polymerisation: $M_n^{\bullet} + M \rightarrow M_{n+1}^{\bullet}$ (M: Monomer)
	Fragmentierung	β-Spaltung: $R\text{-}CH_2\text{-}\dot{C}H_2 \rightarrow CH_2{=}CH_2 + R^{\bullet}$
	Umlagerung	$CH_3\text{-}\dot{C}H\text{-}CH_2Cl \rightarrow CH_3\text{-}CHCl\text{-}\dot{C}H_2$
	Elektronentransfer	$OH^{\bullet} + RO^{-} \rightarrow RO^{\bullet} + OH^{-}$ (Willson, 1978)
Termination (Kettenabbruch)	Rekombination	$R^{\bullet} + R^{\bullet} \rightarrow R\text{-}R$
	Disproportionierung	$2\ CH_3\text{-}\dot{C}H_2 \rightarrow CH_3\text{-}CH_3 + CH_2{=}CH_2$

1.2. Toxikologische Bedeutung chemischer Radikale

1.2.1 Radikalwirkungen in vivo

Radikale können mit vielen biologisch wichtigen Verbindungen, wie Proteinen, Nucleinsäuren, Lipiden und Polysacchariden reagieren (Demopoulos, 1973 a; Übersicht bei Zimmermann, 1982).

Mögliche Folgen sind Veränderung bzw. Verlust von Struktur und/oder Funktion des angegriffenen Zellbestandteiles: Inaktivierung von Enzymsystemen, Inflammation, Mutagenese, Karzinogenese u. a. m. (Übersicht bei Zimmermann, 1982).

Der Radikalwirkung auf Membranlipide kommt in diesem Zusammenhang eine besondere Bedeutung zu, die im folgenden dargestellt werden soll.

1.2.2 Radikalwirkungen auf Membranlipide

1.2.2.1 Lipidperoxidation in vivo und Folgereaktionen

Unter Lipidperoxidation versteht man die primär unter Sauerstoffanlagerung und Peroxidbildung verlaufende oxidative Schädigung mehrfach ungesättigter Fettsäuren (Tappel, 1973), wie sie sowohl in reinen Fetten als auch in den Lipidkomponenten biologischer Membranen vorkommt (Rouser et al., 1968). Mehrfach ungesättigte Fettsäuren gehören nach Vladimirov et al. (1980) zu den wohl unstabilsten organischen Molekülen überhaupt.

Mehrfach ungesättigte Fettsäuren können von Radikalen besonders leicht angegriffen werden, weil sie eine Divinylmethanstruktur ($-CH=CH-CH_2-CH=CH-$) besitzen, bei der aus Mesomeriegründen (Sykes, 1976) die Bindung des Wasserstoffs an das den Doppelbindungen benachbarte Kohlenstoffatom ($-CH_2-$) geschwächt ist (Demopoulos, 1973 a). Radikale können deshalb atomaren Wasserstoff abspalten:

$$\underset{\text{Ausschnitt aus einem Lipid (LH)}}{-CH=CH-CH_2-CH=CH-} + R^{\bullet} \longrightarrow \underset{\text{Ausschnitt aus einem Lipidradikal (L}^{\bullet}\text{)}}{-CH=CH-\overset{\bullet}{C}H-CH=CH-} + RH \qquad (1)$$

Anstelle der eben geschilderten Wasserstoffabstraktion kann sich ein Radikal jedoch auch an die Fettsäure a d d i e r e n (modifiziert nach Reynolds und Moslen, 1980):

$$-CH=CH-CH_2-CH=CH- \;+\; R^{\bullet} \;\rightarrow\; -CH=CH-CH_2-\overset{\bullet}{C}H-\overset{R}{\overset{|}{C}}H \qquad (2)$$

Durch Anlagerung molekularen Sauerstoffs an die radikalischen Produkte von Gleichung (1) bzw. (2) bilden sich Lipidperoxidradikale:

$$L^{\bullet} \;+\; O_2 \;\rightarrow\; LOO^{\bullet} \quad \text{bzw.} \quad RL^{\bullet} \;+\; O_2 \;\rightarrow\; RLOO^{\bullet}$$

(Demopoulos, 1973 a; Tappel, 1973; modifiziert nach Reynolds und Moslen, 1980).

Durch verschiedenste Folgereaktionen, u. a. auch durch Zerfall der Lipidperoxidradikale, ist im Zusammenhang mit peroxidativer Membranschädigung die Entstehung folgender Spezies von Bedeutung:
Lipidperoxide (LOOH), Lipidradikale ($L^{\bullet}$), Lipidperoxidradikale ($LOO^{\bullet}$), Superoxidanionradikale ($O_2^{\bullet -}$), Hydroperoxidradikale ($HOO^{\bullet}$), Singletsauerstoff (O_2^{*}) sowie Lipidvernetzungsprodukte (LOOL)
(Barber und Bernheim, 1967; Tappel, 1973; Mead, 1976; Tappel und Dillard, 1981; Vladimirov et al., 1980).

Als weitere Folgeprodukte der Lipidperoxidation können Alkohole, Aldehyde, Ketone und Epoxide entstehen (Keeney, 1962).

Im Vergleich zum reinen Fett unterliegt die Lipidperoxidation in vivo sehr viel komplexeren Bedingungen (Dianzani und Ugazio, 1978; Tappel und Dillard, 1981).

So spielt die heterogene Zusammensetzung der Zellmembranen für die Verfügbarkeit des für die Peroxidation notwendigen Sauerstoffs insofern eine Rolle, als dieser in unpolaren Medien bedeutend stärker löslich ist (Demopoulos, 1973 a).

Ausserdem erlaubt die Lipidanordnung in vivo eine maximale Wechselwirkung zwischen den ungesättigten Fettsäuremolekülen (Mead, 1976).

Der hohe Gehalt an Katalysatoren begünstigt die Ausbreitung der Lipidperoxidation in biologischen Membranen (Vladimirov et al., 1980), wobei vor allem die Schwermetalle Eisen und Kupfer von Bedeutung sind, insbesondere dann, wenn sie in Hämstruktur vorliegen (Tappel, 1973; Demopoulos, 1973 a).

Weiterhin ist damit zu rechnen, daß makromolekulare Reaktionsprodukte enzymatisch weiterverändert werden und daß endogene Reparationsprozesse stattfinden (Dianzani und Ugazio, 1978; Reynolds und Moslen, 1980).

Von besonderer Bedeutung ist in diesem Zusammenhang das Vorhandensein bestimmter Schutzmechanismen in biologischen Membranen, welche Schädigungen durch Radikale und ihre Folgereaktionen entgegenwirken können (Tappel, 1973; Demopoulos, 1973 b). Nach einer Übersicht bei Zimmermann (1982) handelt es sich hierbei im wesentlichen um Thiole (wie reduziertes Glutathion, Cystein und Methionin), Antioxidantien (Vitamin E, Carotinoide u. a.) sowie Enzyme (Katalase, Glutathion-Peroxidase, Superoxid-Dismutase und Repair Enzyme der Desoxyribonucleinsäure-Synthese).

Es bestehen denn auch beträchtliche Unterschiede in der Empfindlichkeit verschiedener Gewebe für die Lipidperoxidation: Gehirn, Leber und Nieren sind, im Gegensatz zu Geweben mit hoher Zellteilungsrate wie Hoden und Darmepithel, besonders anfällig (Mead, 1976).

1.2.2.2 Zytopathologische Bedeutung der Lipidperoxidation

Es gibt Anzeichen dafür, daß physiologischerweise in vivo eine permanente Lipidperoxidation stattfindet, die deshalb mit dem Leben vereinbar ist, weil sie durch endogene Schutzmechanismen (s. o.) unter Kontrolle gehalten wird (Högberg, 1977; De Matteis, 1978).

Lipidperoxidation spielt bei Alterungsprozessen eine Rolle (Barber und Bernheim, 1967; Epstein und Gershon, 1972; Dianzani und Ugazio, 1978). So stellt Lipofuscin, das Alterspigment in Hirn, Myocard und Hoden, ein Folgeprodukt der Lipidperoxidation dar (Tappel, 1973; Mead, 1976). Hochstein und Jain (1981) berichten von Zusammenhängen zwischen Lipidperoxidation und dem Altern von Erythrozyten.

Bei der Biosynthese der Prostaglandine tritt ein Endoperoxid als Zwischenprodukt auf (Carpenter, 1981).

Lipidperoxidation steht möglicherweise auch im Zusammenhang mit der Regulation der Zellreproduktion und der Erneuerung subzellulärer Partikel (Dianzani und Ugazio, 1978; Vladimirov et al., 1980).

Steigert sich die Lipidperoxidation jedoch über das natürliche Maß hinaus bzw. werden die endogenen Schutzmechanismen durchbrochen, ist sie als pathologischer Prozeß anzusehen (Recknagel et al., 1977 a; Tappel und Dillard, 1981).

Tabelle 2 gibt eine Übersicht über mögliche Konsequenzen peroxidativer Schädigung von Membranlipiden.

Tab. 2: Pathologische Bedeutung der Lipidperoxidation von zellulären und subzellulären Membranen

Biologisches System	Pathologischer Effekt	Referenz
Erythrozyten	Hämolyse, beschleunigtes Altern	Hochstein und Jain, 1981
Mitochondrien	Schwellung, Lysis, Atmungsketteninhibition, Cytochrom-c-Verlust	Hunter et al., 1964 Vladimirov et al., 1980
Lysosomen	Freisetzung lysosomaler Enzyme, intrazelluläre Autodigestion	Fong et al., 1973 Tappel, 1973

Fortsetzung von Tab. 2:

Biologisches System	Pathologischer Effekt	Referenz
Mikrosomale Vesikel, Endoplasmatisches Retikulum	Schwellung, Dichteänderung, Disaggregation der Polyribosomen, Inhibition der Proteinsynthese, Verformbarkeit, Brüche	Robinson, 1965 Tappel, 1973 Dianzani, 1978 Pasquali-Ronchetti et al., 1980
Sarkoplasmatische Membranen	Viskositätserhöhung, gesteigerte Ca^{++}-Permeabilität	Vladimirov et al., 1980
synaptosomale Membranen	Störung des Na^{+}/K^{+}-Gleichgewichts	Sun, 1972
Eidotter-liposomenmembran	Erhöhung des Oberflächenpotentials, Verlust der elektrischen Stabilität	Vladimirov et al., 1980

Außerdem ist eine Inaktivierung u. a. folgender membranassoziierter Enzyme durch eine peroxidative Schädigung von Membranlipiden möglich:
Glucose-6-Phosphatase (Wills, 1971; Recknagel et al., 1977 b),
Aminopyrin-Demethylase (Recknagel et al., 1977 b),
UDP-Glucuronyl-Transferase(Recknagel et al., 1977 a),
ATP-ase (Vladimirov et al., 1980) und
mischfunktionelle Oxygenasen (Recknagel et al., 1977 b; De Matteis, 1978; Pasquali-Ronchetti et al., 1980).

Auch Proteine können im Zusammenhang mit der Lipidperoxidation geschädigt werden: neben der chemischen Veränderung einzelner Aminosäuren (Roubal und Tappel, 1966) sind Proteinpolymerisation durch cross-linking, Spaltung von Polypeptidketten und Störungen in der Proteinanordnung in Mem-

branen möglich (Tappel, 1973).

Folgeprodukte peroxidativ geschädigter Fettsäuren können ebenfalls von pathogenetischer Bedeutung sein: Dianzani und Ugazio (1978) weisen auf eine mögliche Inhibition der Proteinsynthese durch Malondialdehyd hin, Roubal und Tappel (1967) bringen Folgeprodukte der Lipidperoxidation in Zusammenhang mit der Schädigung von Nucleotiden, Tappel (1973) mit intra- und intermolekularem cross-linking von Ribonuclease, Aminen, Nucleinsäuren und Phospholipiden.

2 Nachweis von Radikalen und radikalinduzierter Lipidperoxidation

2.1 Nachweismethoden in vitro

Elektronen-Spin-Resonanzspektroskopie. Das paramagnetische Moment unpaariger Elektronen kann im magnetischen Feld gemessen werden (Borg, 1972). Durch "Einfangen" dieses Spins (spin-trapping) können auch kurzlebige Radikale erfaßt werden (Sykes, 1976; Saprin und Piette, 1977; McCay et al., 1980).

UV-Spektrophotometrie. Mit dieser Methode kann die Lipidperoxidation in Gewebsextrakten durch Prüfung auf Anwesenheit von konjugierten Doppelbindungen nachgewiesen werden (Dahle et al., 1962).

Jod-Titration. Jodid wird in saurer Lösung durch Lipidperoxide zu elementarem Jod oxidiert, welches mit Thiosulfat titriert werden kann (Bunyan et al., 1967). Der Jod-Nachweis kann auch durch kolorimetrische Mikromethoden erfolgen (Asakawa und Matsushita, 1980).

Warburg-Methode. Bei dieser Methode wird die Lipidperoxidation in vitro durch die Bestimmung der Sauerstoffabsorption nachgewiesen (Dillard und Tappel, 1973).

Floureszenzspektroskopie. Fettsäureperoxide können durch Folgereaktionen mit Aminen fluoreszierende Produkte mit der Struktur konjugierter Schiff'scher Basen (R-N=CH-CH=CH-R') bilden, welche fluoreszenzspektroskopisch erfaßt werden können (Purdy und Tappel, 1979; Recknagel et al., 1982).

Chemilumineszenzmethode. Lipidperoxide können sich zu angeregten Carbonylen bzw. Singletsauerstoff zersetzen. Geben

diese angeregten Moleküle Energie als Photonen ab, können letztere mittels Photomultiplier erfaßt werden (Boveris et al., 1981).

Massenspektrometrie. Mit der Massenspektrometrie ist die Bestimmung von Oxidationsprodukten mehrfach ungesättigter Fettsäuren möglich (Wiegand und Frank, 1982).

Malondialdehydnachweis. Die Malondialdehydbestimmung eignet sich besonders zur Erfassung von Zeitverlauf und Ausmaß einer Lipidperoxidation in einem Gewebe und ist als In-Vitro-Methode weit verbreitet (Recknagel et al., 1982). Nach Dahle et al. (1962) ist bei der Entstehung von Malondialdehyd ($OHC-CH_2-CHO$) aus Fettsäureperoxidradikalen die Bildung von Endoperoxiden als Zwischenprodukte von Bedeutung. Malondialdehyd bildet mit Thiobarbitursäure ein rotes Pigment, das anhand seines Absorptionsmaximums bei 535 nm photometrisch bestimmt werden kann (Dahle et al., 1962; Bernheim et al., 1948; Terao und Matsushita, 1981; Recknagel et al., 1982).

Die Anwendung der Fluoreszenzspektroskopie, der Chemilumineszenzmethode und der Massenspektrometrie zum Nachweis einer Lipidperoxidation in vivo wird diskutiert (Boveris et al., 1981; Wiegand und Frank, 1982).

2.2 Nachweismethoden in vivo

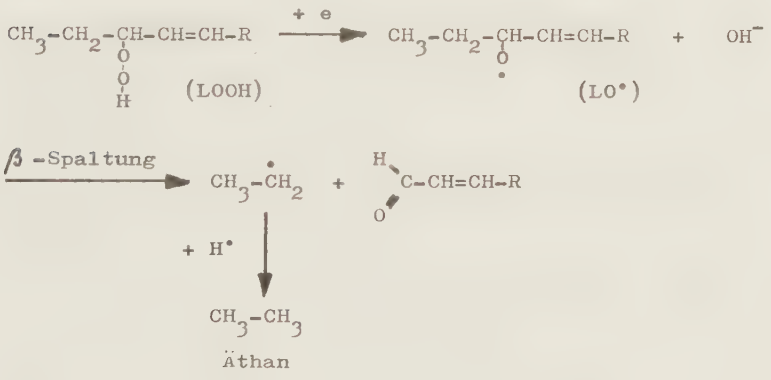
Bestimmung der Glutathionkonzentration des Serums. Aus der Menge des aus einem Organ ins Blut freigesetzten oxidierten Glutathions (GSSG) können Rückschlüsse auf Lipidperoxidation und Glutathion-Peroxidase-Aktivität in diesem Organ gezogen werden (Bartoli und Sies, 1978).

Identifizierung und quantitative Bestimmung flüchtiger Kohlenwasserstoffe in der Exspirationsluft. Folgende kurzkettige Kohlenwasserstoffe können in vivo als Zerfallsprodukte peroxidativ geschädigter Membranlipide gebildet werden:

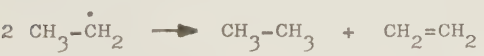
Ä t h a n (Riely et al., 1974; Dillard et al., 1977; Hafeman und Hoekstra, 1977; Koester et al., 1977; Schmid, 1979; Schmid und Christoph, 1980; Schmid und Jungbauer, 1980;

Schmid und Jungbauer, 1982; Recknagel et al., 1982; Cohen et al., 1968; Gee und Tappel, 1981), Äthen (Frank et al., 1978; Hintze und Remmer, 1979; Schmid und Jungbauer, 1980; Schmid und Beuter, 1982; Cohen et al., 1968; Gee und Tappel, 1981) sowie Pentan (Dillard et al., 1977; Dillard und Tappel, 1979; Tappel, 1980; Tappel und Dillard, 1981; Recknagel et al., 1982).

Die Bildung kurzkettiger Kohlenwasserstoffe kann ihren Ausgang von Lipidhydroperoxiden (LOOH) nehmen, die durch Elektronenaufnahme zu Alkoxyradikalen (LO•) umgesetzt werden. Übergangsmetalle wie Eisen und Kupfer können hierfür Elektronen (e) bereitstellen. Analog zur Pentanbildung (Dumelin und Tappel, 1977) kann man sich die Bildung von Äthan wie folgt vorstellen:



Äthanradikale können neben einer Reduktion zu Äthan auch zu Äthan und Äthen disproportionieren (Dumelin und Tappel, 1977; Gee und Tappel, 1981):



Daneben können bei der Zersetzung von Fettsäuren im Initialstadium noch weitere gasförmige Kohlenwasserstoffe, wie Methan, Propan und Butan, auftreten (Recknagel et al., 1982).

3 Radikalbildung

3.1 Spontane Radikalbildung

Homolytischer Bindungsbruch durch Energieabsorption. Radikale entstehen, wenn sich bei der Lösung einer chemischen Bindung die beiden Bindungselektronen gleichmäßig auf die daraus hervorgehenden Fragmente verteilen:

$R:R' \longrightarrow R^{\bullet} + R^{\bullet\prime}$ (Pryor, 1966).

Dieser auch als homolytischer Bindungsbruch bezeichnete Vorgang kann aus einer Molekülanregung infolge Energieabsorption resultieren. In Abhängigkeit von der Dissoziationsenergie der zu spaltenden Bindung (Sykes, 1976) kommen hierfür verschiedene Energieformen in Betracht, z. B. Wärmeenergie (Thermolyse), UV-Strahlung (Photolyse) oder radioaktive Strahlung (Radiolyse) (Pryor, 1966).
Radikalbildung durch Schwermetalle. Bestimmte Schwermetalle sind zu einem Elektronentransfer auf Moleküle fähig (unter gleichzeitiger Änderung ihrer Oxidationsstufe), wodurch Radikale entstehen können (Übersicht bei Beuter, 1982 a).
Radikalbildung durch Umweltgifte. Unter den radikalbildenden Umweltgiften sind die Bestandteile des Smogs, wie Ozon, Singletsauerstoff (O_2^*) und Stickoxide (NO, NO_2) von besonderer Bedeutung (Pryor, 1976).

3.2 Metabolische Radikalbildung

3.2.1 Bedeutung des Fremdstoffmetabolismus

Unsere Umwelt ist mit mehr als 4 Millionen verschiedener synthetischer Verbindungen kontaminiert (Ingelman-Sundberg, 1980). Eine Vielzahl dieser körperfremden Substanzen, die man auch als Xenobiotica bezeichnet, ist hochtoxisch (Nebert et al., 1981) und vermag infolge hoher Lipidlöslich-

keit in den Organismus zu gelangen (Jenner et al., 1981).

Da die Niere als hauptsächliches Ausscheidungsorgan zwar für die Exkretion ionischer und polarer Verbindungen gut ausgerüstet ist, fettlösliche Stoffe jedoch über die Lipoproteinmembranen der renalen Tubuli reabsorbiert werden können, würden lipophile Fremdstoffe, ggf. mit biologischer Wirksamkeit, auf unbestimmte Zeit im Körper verbleiben (Schenkman und Gibson, 1981).

Die Entwicklung von Enzymsystemen, die Fremdstoffe metabolisieren und ausscheidungsfähig machen, erscheint daher als evolutionäre Notwendigkeit (Jenner et al., 1981).

Fremdstoffmetabolisierung kann jedoch auch zu einer "Aktivierung" dergestalt führen, daß eine - ursprünglich vielleicht inerte - Verbindung in eine Form mit größerer chemischer Reaktivität und höherer biologischer Toxizität übergeführt wird (Cohen, 1978; Slater, 1978).

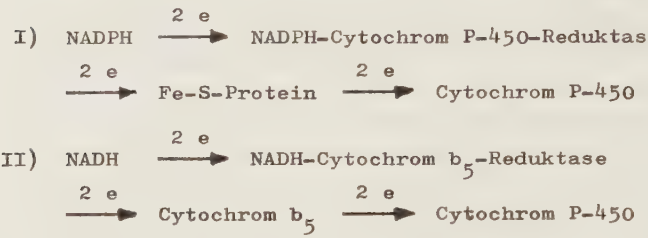
3.2.2 Mischfunktionelle Oxygenasen (MFO)

Am Metabolismus lipophiler Fremdstoffe sind die mischfunktionellen Oxygenasen (MFO) wesentlich beteiligt (Gaudette und Brodie, 1959; Gilette, 1966; Nebert et al., 1981), sie setzen jedoch auch Substrate endogenen Ursprungs, wie Gallensäuren, Steroidhormone und Prostaglandine um (Jenner et al., 1981; Nebert et al., 1981).

Nach Ullrich (1977) sowie Bonse und Metzler (1978) umfassen die von den MFO katalysierten Reaktionen folgendes Spektrum: aliphatische und aromatische Hydroxylierung; Epoxidierung aromatischer und olefinischer Doppelbindungen; oxidative Desalkylierung von N-, O- und S-Alkylverbindungen; Oxidation von Thioäthern und -aminen zu Sulfoxyden bzw. Hydroxylaminen; reduktive Dehalogenierung.

Funktionell gesehen stellen die MFO ein Enzymsystem dar, bei dem mittels Enzymketten Elektronen (e) von reduziertem Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NADH; mit Elektronen überwiegend aus dem Zitronensäurezyklus und der Atmungskette) bzw. reduziertem Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH; mit Elektronen überwiegend aus dem Pentosephosphat-

zyklus) auf das terminale "Cytochrom P-450" übertragen werden, durch welches dann die eigentliche Metabolisierung des Fremdstoffes bewerkstelligt wird (Schenkman und Gibson, 1981; Schmid, 1982 a):



"Cytochrom P-450" wurde als Hämoprotein identifiziert (Omura und Sato, 1964 a und b) und nach der Spektralabsorptionsbande bezeichnet, die die reduzierte Form mit Kohlenmonoxyd bildet (Klingenberg, 1958). Die Bezeichnung umfaßt eine Gruppe von Isoenzymen, von denen heute mehr als 20 verschiedene Spezies bei diversen Tierarten und dem Menschen beschrieben sind (Lu und West, 1980).

Diese Isoenzyme besitzen trotz überlappender Substratspezifität (Schenkman und Gibson, 1981) oft bemerkenswerte Positions- und Stereoselektivität und unterscheiden sich in Proteinstruktur, Spektraleigenschaften, katalytischer Aktivität, elektrophoretischer Trennbarkeit, Alters- und Geschlechtsabhängigkeit der Enzymaktivität sowie Induzier- und Hemmbarkeit (s. u.) u. a. m. (Lu und West, 1980).

Cytochrom P-450-Spezies haben eine ubiquitäre Organ- und Gewebsverteilung und sind bei Vertebraten bisher immer nur membrangebunden gefunden worden, vor allem im endoplasmatischen Retikulum, daneben auch in Mitochondrien (Schenkman und Gibson, 1981). Jedoch bestehen qualitative und/oder quantitative Unterschiede in der Enzymaktivität verschiedener Gewebe bzw. Organe (Burke und Orrenius, 1979).

Die Metabolisierungsrate von Xenobiotica kann durch I n d u k t i o n der MFO gesteigert bzw. durch H e m m u n g des Enzymsytems vermindert werden.

Zahlreiche Verbindungen sind als Induktionsstoffe bekannt, die ihren eigenen Metabolismus und/oder die Biotransforma-

tion anderer Xenobiotica zu stimulieren vermögen (Nebert et al., 1981).

Eine Hemmung der Aktivität der MFO ist möglich durch die Interaktion eines Inhibitors mit einem Cytochrom P-450, wie Bindung des Inhibitors an das Häm-Eisen oder in dessen Nachbarschaft (z. B. Kohlenmonoxyd, Metyrapon) bzw. an die Substratbindungsstelle (z. B. Proadifen) oder feste Bindung eines bei der Umsetzung eines Substrates gebildeten Metaboliten an das Enzym (z. B. Piperonylbutoxid), weiterhin durch die Inhibition der Reduktion eines Cytochroms P-450 (z. B. durch Antikörper gegen Reductasen) u. a. m. (Netter, 1980).

3.2.3 Radikalbildung durch die MFO

Xenobiotica (X) können als Substrate von einem Cytochrom P-450 (E_o: oxidiertes, E_r: reduziertes Enzym) wie folgt umgesetzt werden (Schmid, 1982 a):

A) Fremdstoffoxidation ($X + O \longrightarrow XO$)

1) $X + E_o \longrightarrow (XE_o)$

2) $(XE_o) + e \longrightarrow (XE_r)$ /e: Elektron

3) $(XE_r) + O_2 \longrightarrow (XE_oO_2^{\bullet -}) \longrightarrow (XE_rO_2)$

3a) $(XE_oO_2^{\bullet -}) \longrightarrow (XE_o) + O_2^{\bullet -}$

4) $(XE_oO_2^{\bullet -}) + e \longrightarrow (XE_rO_2^{\bullet -}) \longrightarrow (XE_oO_2^{2-})$

4a) $(XE_oO_2^{2-}) \longrightarrow (XE_o) + O_2^{2-}$

5) $(XE_rO_2^{\bullet -}) + 2\,H^+ \longrightarrow XO + E_o + H_2O$

wobei das Elektron in Gleichung 2) von NADPH, das Elektron in Gleichung 4) von NADPH oder NADH bereitgestellt wird.

Aus dem oben angegebenen Reaktionsschema geht hervor, daß die MFO (bei der Fremdstoffoxidation ?) Superoxidradikale (Gleichung 3a)) und Peroxide (Gleichung 4a)) erzeugen können, was durch Elektronenüberschuß begünstigt wird (Schmid, 1982 a).

Superoxidradikale und Peroxide können möglicherweise zu sehr reaktionsfähigen Hydroxylradikalen ($HO^{\bullet}$) bzw. singlet-

sauerstoff (O_2^*) weiterreagieren (Hill, 1979; Willson, 1979), worin vermutlich eine der Ursachen für die "physiologische" Lipidperoxidation in vivo zu suchen ist (Schmid, 1982 a).

B) Fremdstoffreduktion ($X + e + H^+ \longrightarrow XH$ bzw. $X + e \longrightarrow X^-$)

6) $X + E_o \longrightarrow (XE_o)$

7) $(XE_o) + e \longrightarrow (XE_r)$

8a) $(XE_r) + H^+ \longrightarrow XH + E_o$ oder

8b) $(XE_r) \longrightarrow X^- + E_o$

Starker Elektronenüberschuß oder niedriger Sauerstoffpartialdruck begünstigen die reduktive Metabolisierung eines Xenobioticums (Schmid, 1982 a).

C) Metabolische Radikalbildung

Ein Fremdstoff kann vor allem dann zu Radikalen biotransformiert werden, wenn es sich um eine Verbindung handelt, die sich bei der Umsetzung durch die MFO r e d u k t i v spalten läßt (Reynolds und Moslen, 1980; McCay et al., 1980). Der Vorgang kann durch folgende Gleichung zusammengefaßt werden (XY: Fremdstoffmolekül, X•: Fremdstoffradikal):

9) $XY + E_r \longrightarrow X^\bullet + Y^- + E_o$

Besonders gut untersucht ist eine derartige metabolische Radikalbildung bei Tetrachlorkohlenstoff (Recknagel et al., 1977 a) und anderen halogenierten Kohlenwasserstoffen (Reynolds und Moslen, 1980).

4 Methoxyfluran

4.1 Bedeutung und Verwendung

Aufgrund der Untersuchungen beim Hund, die Van Poznak und Artusio seit 1956 mit einer Reihe fluorierter Kohlenwasserstoffe bzw. Äther durchführten, wurde Methoxyfluran zur Prü-

fung beim Menschen vorgeschlagen (Artusio et al., 1960).

Seit 1959 befindet sich dieses Inhalationsanästhetikum im klinischen Gebrauch der Humanmedizin (Klein und Jeffries, 1966) und fand kurz darauf auch Eingang in die Tiermedizin (Bohn, 1975).

In den Jahren 1962 bis 1971 wurden weltweit allein beim Menschen ca. 15 Millionen Narkosen unter Verwendung von Methoxyfluran durchgeführt (Herstellerangabe).

Seine weite Verbreitung verdankte Methoxyfluran gewissen Vorzügen, wie Nicht-Entflammbarkeit unter Operationsbedingungen, starke anästhetische Potenz, schneller Eintritt eines analgetischen Zustandes bei erhaltenem Bewußtsein und die Möglichkeit einer Selbstapplikation durch den Patienten (Van Poznak, 1972). Methoxyfluran wurde besonders häufig in der humanmedizinischen Geburtshilfe eingesetzt.

Im Laufe der Zeit stellte sich jedoch heraus, daß sich die Substanz hinsichtlich ihres Metabolismus nicht so neutral verhielt, als ursprünglich angenommen worden war. Darüber hinaus häuften sich bald Berichte über z. T. fatale Folgen im Zusammenhang mit der Anwendung von Methoxyfluran (siehe unten).

Die Bedeutung von Methoxyfluran ist daher bezüglich seiner klinischen Anwendung in der Humanmedizin stark zurückgegangen (Van Dyke, 1981). Vor kurzem konnte gezeigt werden, daß der Ersatz aller Wasserstoffatome des Methoxyfluran-Moleküls durch Deuterium zu einer Verringerung der Metabolisierung und der Nephrotoxizität des Allgemeinanästhetikums führt. Der praktische Einsatz von deuteriertem Methoxyfluran scheiterte jedoch bisher aus Kostengründen (Hitt et al., 1979; Baden et al., 1979 und 1982).

In der Tiermedizin wird Methoxyfluran jedoch noch häufig verwendet (Bohn, 1975; Brunson et al., 1979; Buntenkötter, 1979; McGrath et al., 1981; Ward und Byland, 1982).

4.2 Chemische und physikalische Eigenschaften

Methoxyfluran ist der 2,2-Dichlor-1,1-difluor-ethyl-methyl-

ether mit einer Molekülmasse von 165,0 (Halsey, 1980) und folgender Strukturformel:

Durch die induktive Wirkung der Fluoratome bleibt jedoch wenig von der Stabilität eines Äthers übrig (Larsen, 1972).

Bei Zimmertemperatur ist Methoxyfluran eine klare, farblose Flüssigkeit mit charakteristischem, fruchtigem Geruch (Artusio et al., 1960) und einer Dichte (bei 20 °C) von 1,42 $g.cm^{-3}$ (Halsey, 1980).

Da Methoxyfluran an der Luft langsam oxidiert wird, ist Butylhydroxytoluol (0,01 % Masse/Masse) bei der handelsüblichen Flüssigkeit zugesetzt (Halsey, 1980).

Der Siedepunkt von Methoxyfluran liegt mit 104,7 °C sehr hoch, die Dampfentwicklung aus 1 ml Flüssigkeit (bei 20 °C) fällt jedoch mit 208 cm^3 in den Bereich der übrigen dampfförmig applizierten Inhalationsanästhetika (Halsey, 1980).

4.3 Stoffwechselverhalten

4.3.1 Resorption

Wie bei allen Inhalationsanästhetika hängt die Aufnahme von Methoxyfluran von folgenden Faktoren ab (Büch und Büch, 1980):

- dem Partialdruck des Anästhetikums im Alveolarraum (beeinflußt vom Partialdruck in der Inspirationsluft und vom Atemminutenvolumen)
- dem Diffusionsprozeß Alveolarlumen/Blut (beeinflußt von der Permeabilität der Alveolarmembran, der verfügbaren Alveolarfläche und dem Partialdruckgradienten Alveolarraum/Blut)
- der Lungen - und Organperfusion sowie der Ablagerung in den Geweben.

Da sich das Partialdruckgleichgewicht zwischen Inhalationsluft und Blut um so schneller einstellt, je geringer die Blutlöslichkeit eines Inhalationsanästhetikums ist (Büch

und Büch, 1980), hat die hohe Blutlöslichkeit von Methoxyfluran (Blut/Gas-Verteilungskoeffizient 13,0 bei 37 °C; Halsey, 1980) eine langsame Einleitungsphase zur Folge (Thomason et al., 1962).

4.3.2 Endogene Verteilung

Nach Fiserova-Bergerova und Holaday (1979) unterliegt auch die endogene Verteilung - wie die Resorption - den Regeln des Partialdruckausgleiches zwischen verschiedenen Kompartimenten (Verteilungsräumen) des Organismus'.

Von wesentlicher Bedeutung für die Verteilung von Methoxyfluran ist die Durchblutungsrate der Gewebe und Organe (so ist der Zustrom zu gefäßreichen Geweben, wie Gehirn, Leber, Nieren und Herz, bedeutend größer als z. B. der Zustrom zum Fettgewebe) sowie seine substanzspezifische Löslichkeit in den einzelnen Geweben. Ein Maß hierfür sind die Gewebe/Blut-Verteilungskoeffizienten, für die Eger II (1980) folgende Werte angibt:

Gehirn/Blut :	1,7
Muskel/Blut :	1,3
Fett/Blut :	49

Es ist zu erwarten, daß Methoxyfluran nur langsam in die Gewebe diffundiert (gute Blutlöslichkeit), im Fettgewebe jedoch besonders stark gespeichert und nur langsam wieder freigesetzt wird (hohe Lipidlöslichkeit: Öl/Gas-Verteilungskoeffizient 950 bei 37 °C; Halsey, 1980).

4.3.3 Metabolisierung

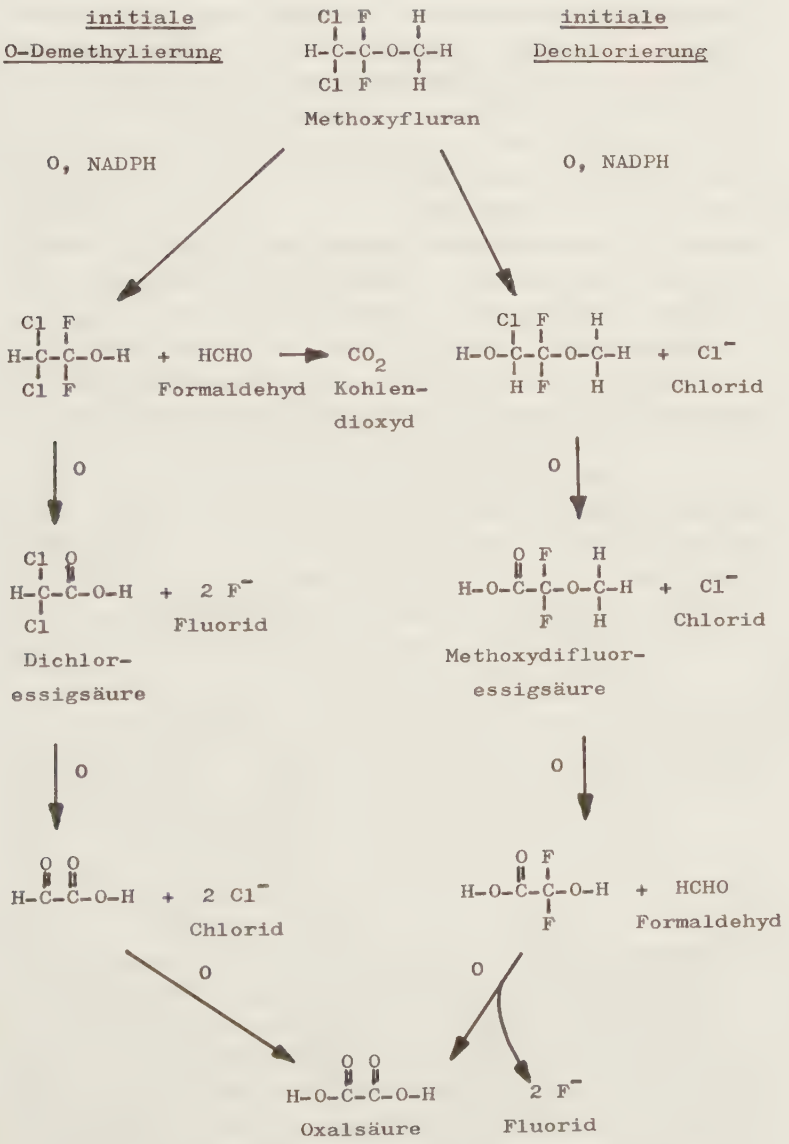
Es ist bekannt, daß Methoxyfluran bei Mensch, Ratte, Kaninchen, Maus, Affe, Hund, Schwein und Rind metabolisiert wird (Halsey et al., 1971; Murray und Fleming, 1972; Fiserova-Bergerova, 1973), wobei jedoch nur die drei erstgenannten Spezies genauer untersucht sind.

Aufgrund seiner Lipidlöslichkeit ist zu erwarten, daß

Methoxyfluran ein typisches Substrat der fremdstoffmetabolisierenden Enzyme darstellt. Der direkte Beweis dafür, daß die Substanz von den MFO umgesetzt wird, steht derzeit noch aus (Waskell und Gonzales, 1982). Zahlreiche Hinweise deuten jedoch darauf hin, daß die Biotransformation von Methoxyfluran durch das genannte Enzymsystem bewerkstelligt wird:

- Methoxyfluran erzeugt in vitro mit wenigstens zwei Formen von Cytochrom P-450 typische Bindungsspektren (Ivanetich et al., 1979; Takahashi et al., 1974);
- in vivo kann die Metabolisierung von Methoxyfluran durch Phenobarbital- bzw. 3-Methylcholanthren-Vorbehandlung gesteigert (Van Dyke, 1966; Fiserova-Bergerova, 1973; Cousins et al., 1974; Brodeur et al., 1976; Hitt und Mazze, 1977) sowie in vitro durch Kohlenmonoxyd, Metyrapon und Proadifen gehemmt werden (Takahashi et al., 1977; Ivanetich et al., 1979);
- in vitro erfordert die Metabolisierung von Methoxyfluran reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH), Sauerstoff und das Enzym Cytochrom P-450-Reductase (Waskell und Gonzales, 1982; Ivanetich et al., 1979; Takahashi et al., 1977);
- in vitro stimuliert Methoxyfluran den Elektronenfluß von reduziertem Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NADH) bzw. -Phosphat (NADPH) auf Cytochrom b_5 (Ivanetich et al., 1980) und
- Methoxyfluran bewirkt selbst Enzyminduktion (Van Dyke, 1966; Berman und Bochantin, 1970).

Folgende Metaboliten von Methoxyfluran sind bisher bekannt und isoliert worden: Kohlendioxyd, Chlorid, Fluorid, Methoxydifluoressigsäure, Dichloressigsäure, Oxalsäure und Formaldehyd (Van Dyke et al., 1964; Van Dyke und Chenoweth, 1965; Holaday et al., 1970; McIntyre et al., 1973; Takahashi et al., 1977; Waskell und Gonzales, 1982). Es wurden daher von den genannten Autoren zwei oxidative Abbauwege für Methoxyfluran vorgeschlagen (qualitativ):

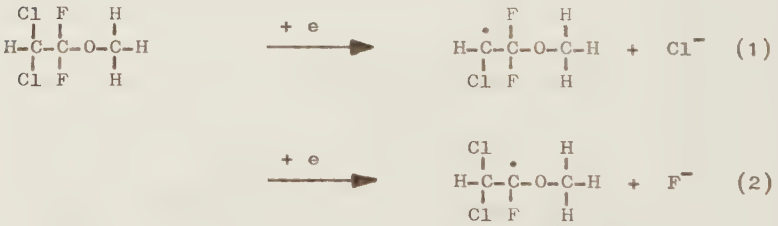


Aufgrund der Bindungsstärken im Methoxyfluran-Molekül sollte die initiale O-Demethylierung (linke Seite des vor-

stehenden Reaktionsschemas) bevorzugt sein (Loew et al., 1974). Bei der enzymatischen Umsetzung von Methoxyfluran überwiegt jedoch die initiale Dechlorierung (rechte Seite des Reaktionsschemas) in vivo (Holaday et al., 1970) und in vitro (Ivanetich et al., 1979) gegenüber der initialen Spaltung der Ätherbindung.

McCay et al. (1980) konnten i n v i t r o Radikale nachweisen, wenn Methoxyfluran in Gegenwart eines Systems, das reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat erzeugte, mit Rattenlebermikrosomen inkubiert wurde (die Mikrosomenfraktion stellt Trümmer des glatten endoplasmatischen Retikulums dar, die nach biochemischer Aufarbeitung der Hepatozyten anfallen, und weist einen hohen Gehalt an mischfunktionellen Oxygenasen auf - Schmid, 1982 a).

Bei der Verstoffwechslung von Methoxyfluran muß demnach mit einer Radikalbildung gerechnet werden, die man sich in Analogie zur Metabolisierung von Tetrachlorkohlenstoff (Recknagel et al., 1977 a) und anderen Halogen-Kohlenwasserstoffen (Reynolds und Moslen, 1980) grundsätzlich als Folge einer reduktiven Halogenabspaltung vorstellen kann:



(1)

(2)

Fluor besitzt allerdings die stärksten nucleophilen Eigenschaften bzw. den kleinsten Atomradius unter den Halogenen, bildet daher die stabilsten Halogen-Kohlenstoffbindungen (Dailey, 1960). Es ist deshalb anzunehmen, daß eine metabolische Radikalbildung aus Methoxyfluran überwiegend als reduktive Chlorabspaltung (Gleichung (1)) - weniger als reduktive Fluorabspaltung (Gleichung (2)) - verläuft, zumal bekannt ist, daß UV-Licht hoher Intensität

eine h o m o l y t i s c h e Spaltung der Chlor-Kohlenstoff-Bindungen des Methoxyfluran-Moleküls verursacht (Larsen, 1972).

Die Metabolisierungsrate von Methoxyfluran ist mit 50 bis 70 % einer resorbierten Dosis im Vergleich zu Halothan mit ca. 15 % bzw. Enfluran mit 2 bis 5 % außerordentlich hoch (Marshall und Wollman, 1980). Dies ist vermutlich durch die hohe Lipidlöslichkeit von Methoxyfluran bedingt, da die Umsetzbarkeit eines Fremdstoffes durch die mischfunktionellen Oxygenasen mit dessen Lipidlöslichkeit positiv korreliert ist (Schenkman und Gibson, 1981).

Im übrigen hat sich gezeigt, daß der Umfang der Metabolisierung von Methoxyfluran dosisabhängig ist: bei niedrigen Konzentrationen in der Atemluft und bei kurzer Expositionsdauer - also bei niedrigen Dosen - ist er am größten (White et al., 1979 a). Eine Erklärung für dieses Phänomen könnte darin bestehen, daß Methoxyfluran seine Biotransformation selbst dadurch hemmt, daß die mischfunktionellen Oxygenasen durch entstehende Methoxyfluranmetaboliten inaktiviert werden und diese Inaktivierung bei höheren Methoxyflurandosen schneller eintritt.

Schließlich sind noch Unterschiede in der Metabolisierungsrate von Methoxyfluran zwischen verschiedenen Rattenstämmen bekannt (Mazze et al., 1973), die durch qualitative und/oder quantitative Aktivitätsunterschiede der fremdstoffmetabolisierenden Enzyme bedingt sein könnten.

4.3.4 Ausscheidung

Mehr als ein Drittel des resorbierten Methoxyflurans wird weder als solches noch in Form seiner Metaboliten beim Menschen innerhalb eines Zeitraumes von 10 Tagen postnarkotisch ausgeschieden (Holaday und Fiserova-Bergerova, 1979).

Nach den genannten Autoren könnte dies verursacht sein durch Speicherung des Anästhetikums im Fettgewebe (hohe Lipidlöslichkeit), aber auch durch kovalente Bindung intermediär gebildeter Metaboliten an Gewebsbestandteile (hohe Metabolisierungsrate). Letzteres wäre eine

typische Radikalreaktion (siehe 1.2.1 der Literaturübersicht).

Im übrigen wird Methoxyfluran selbst wieder über die Lunge abgeatmet, wobei das Inhalationsanästhetikum in der End-Exspirationsluft von Patienten noch 10 bis 18 Tage nach der Narkose, von Anästhesiologen noch 30 Stunden nach der Exposition nachgewiesen werden konnte (Corbett und Ball, 1974).

Von den bekannten Metaboliten des Methoxyflurans wird das Kohlendioxyd, das aus Formaldehyd entstehen soll, über die Lunge ausgeschieden (Van Dyke et al., 1964; Takahashi et al., 1977), die organischen Säuren sowie die Chlorid- und Fluoridionen gelangen über die Nieren in den Harn; andere Ausscheidungswege sind unbedeutend (Holaday und Fiserova-Bergerova, 1979; Van Dyke et al., 1964).

Eine Besonderheit zeigt das gebildete Fluorid, da es neben renaler Exkretion etwa zur Hälfte in das Skelett eingebaut wird, was einerseits als eine Art Schutzmechanismus gegen zu hohe Fluoridspiegel im Blut angesehen werden kann (Holaday und Fiserova-Bergerova, 1979), andererseits jedoch auch zu schweren pathologischen Folgen führen kann (Klemmer und Hadler, 1978).

4.4 Pharmakologische Eigenschaften

4.4.1 Klinisches Wirkungsbild

Nach Herstellerangaben bewirkt Methoxyfluran Anästhesie und/oder Analgesie, wobei vier Stufen der Narkosetiefe unterschieden werden können, die von Analgesie ohne Bewußtseinsverlust bis zur tiefen Allgemeinanästhesie reichen. Diese letzte Stufe wird bei Methoxyfluran nicht empfohlen.

Die starke anästhetische Potenz von Methoxyfluran zeigt sich in der niedrigen minimalen Alveolar-Konzentration (MAC), die von Halsey (1980) mit 0,16 Vol % angegeben wird.

Methoxyfluran hemmt die Herzfunktion und kann Arrhythmien erzeugen (Verspohl, 1981). Die Sensibilisierung des Myocards gegenüber Catecholaminen ist jedoch gering (Black, 1980).

Bei Hund und Katze soll außerdem die Catecholaminfreisetzung aus dem Nebennierenmark durch Methoxyfluran vermindert werden

(Dreyer et al., 1974).

Hilwig (1976) beobachtete beim Hund eine Herzfrequenzsteigerung proportional der venösen Methoxyflurankonzentration.

Der Blutdruck fällt beim Menschen (Black, 1980) und beim Hund (Dobkin und Fedoruk, 1961) mit zunehmender Narkosetiefe ab.

Bei Mensch (Black, 1980) und Hund (Dobkin und Fedoruk, 1961; Bohn, 1975; Hilwig, 1976) erzeugt Methoxyfluran eine dosisabhängige Atemdepression.

Als vorteilhaft wird die muskelrelaxierende Wirkung von Methoxyfluran angesehen (Artusio et al., 1960; Van Poznak, 1972).

4.4.2 Pathologische Methoxyfluranwirkungen

4.4.2.1 Nephrotoxizität

Klinik. Die nephrotoxische Wirkung von Methoxyfluran äußert sich klinisch wie folgt:

Hauptsymptom ist eine initiale P o l y u r i e, die gegenüber dem antidiuretischen Hormon resistent ist, zur Dehydratation mit Gewichtsverlust und Anstieg der Plasmaosmolarität führt (Crandell et al., 1966; Frascino et al., 1970; Panner et al., 1970; Mazze et al., 1971 und 1972; Fry et al., 1973; Halpren et al., 1973; Mazze und Cousins, 1973; Whitford und Taves, 1973; Barr et al., 1974; Gottlieb und Trey, 1974; Brodeur et al., 1976; Dahlgren und Goodrich, 1976) und später in eine O l i g u r i e übergehen kann (Halpren et al., 1973; Diezi, 1980).

Weitere Befunde sind Hypernatriämie, Hyperchlorämie, Hyperkaliämie, Azotämie mit Anstieg des Serum-Harnstoff-Stickstoffs, des Serum-Creatinins und der Serum-Harnsäure (Crandell et al., 1966; Elkington et al., 1968; Panner et al., 1970; Mazze et al., 1971; Mazze und Cousins, 1973; Churchill et al., 1974; Brodeur et al., 1976; Dahlgren und Goodrich, 1976; Robertson und Hamilton, 1976).

Die Unfähigkeit, den Harn zu konzentrieren, zeigt sich in erniedrigter Osmolarität des Harns, wobei auch Natrium-, Kalium- und Harnstoff-Stickstoff-Gehalt herabgesetzt sein

können (Paddock et al., 1964; Mazze et al., 1972; Whitford und Taves, 1973; Churchill et al., 1974).

Pathologische Anatomie. Hervorstechendster Befund sind T u b u l u s n e k r o s e n mit überwiegender Lokalisation im Bereich des proximalen Tubulus contortus. Die betroffenen Tubulusabschnitte sind dilatiert, im Lumen finden sich abgeschilferte nekrotische Tubuluszellen und "pathologisches Protein"; die zellulären Veränderungen degenerierter Epithelabschnitte bestehen in Karyorrhexis bzw. -pyknose, mitotischen Figuren, basalen Fetttröpfchen, hypereosinophilen Foci, Schwellung und Ruptur der Mitochondrien (Kosek et al., 1972; Mazze et al., 1972; Churchill et al., 1974; Cousins et al., 1974; Gottlieb und Trey, 1974). Spätbilder reichen von einer Vermehrung des interstitiellen Bindegewebes (Churchill et al., 1974) bis zur schweren Fibrose (Halpren et al., 1973; Gottlieb und Trey, 1974; Diezi, 1980). Im Falle einer Regeneration von Tubulusepithelzellen kann eine Anreicherung von braunen Lipofuscingranula (Folgeprodukt der Lipidperoxidation - Tappel, 1973) beobachtet werden (Mazze et al., 1972).

Die Veränderungen bei den Glomerula, distalen Tubuli und Sammelrohren sind meist gering (Mazze et al., 1972).

Häufig wurde auch das Ausfallen von Kalziumoxalatkristallen im Tubuluslumen festgestellt (Paddock et al., 1964; Frascino et al., 1970; Kuzucu, 1970; Panner et al., 1970; Mazze et al., 1972; Halpren et al., 1973; Gottlieb und Trey, 1974; Diezi, 1980).

Ätiologie und Pathogenese. Die nephrotoxische Wirkung von Methoxyfluran hat sich als dosisabhängig erwiesen (Cousins et al., 1972; Gottlieb und Trey, 1974).und ist mit der Metabolisierung des Inhalationsanästhetikums insofern korreliert, als sie durch Induktion der fremdstoffmetabolisierenden Enzyme mit Phenobarbital gesteigert (Halpren et al., 1973; Brodeur et al., 1976; Baden et al., 1982), durch Enzymhemmung mit Proadifen verringert werden kann (Cousins et al., 1974).

Hauptursache für die Nierenschädigung soll das bei der Verstoffwechslung von Methoxyfluran gebildete anorganische Fluorid sein, da die Fluoridspiegel im Blut nach Methoxy-

fluran in der Regel erhöht sind (Taves et al., 1970; Cousins et al., 1972; Mazze et al., 1972; Fry et al., 1973; Whitford und Taves, 1973). Es wurden mehrere Mechanismen vorgeschlagen, durch die die nierenschädigende Wirkung von Fluorid erklärt werden könnte (Wechselwirkung mit dem Natriumtransportsystem im proximalen Tubulus, Inhibition von Enzymsystemen des zellulären Energietransfers, Interferenz mit der Aktion des antidiuretischen Hormons infolge Inhibition der Adenylatcyclase, Beeinflussung des renalen Gegenstromprinzips durch Vasodilatation). Der genaue Wirkungsmechanismus ist jedoch noch nicht bekannt (Cohen, 1978).

Nach Pedersoli (1977) könnten erhöhte Plasmafluoridspiegel genausogut Folge statt Ursache einer Nierenschädigung sein.

Es wird außerdem - mit einer Ausnahme (Ndiritu und Weigel, 1977) - immer wieder berichtet, daß Methoxyfluran bei Carnivoren, speziell beim Hund, nicht nephrotoxisch ist, selbst wenn nach Methoxyfluran eine Erhöhung des anorganischen Fluorids im Blut nachgewiesen werden konnte (Cale et al., 1962; Messick et al., 1972; Perdersoli, 1977; Brunson et al., 1979; Fleming und Pedersoli, 1980; Ward und Byland, 1982).

Die pathogenetische Bedeutung der Oxalsäure, die ebenfalls als möglicher Methoxyfluran-Metabolit gilt, wird im Vergleich zu anorganischem Fluorid gering eingeschätzt und soll hauptsächlich in einer Verschlechterung des Krankheitsbildes bestehen (Mazze et al., 1972; Mazze und Cousins, 1973; Gottlieb und Trey, 1974).

Bisher konnte auch noch nicht ausgeschlossen werden, ob andere Metaboliten von Methoxyfluran für dessen Nephrotoxizität mitverantwortlich sind (Cousins et al., 1974; Mazze und Hitt, 1976; Pedersoli, 1977).

So könnte eine Nierenschädigung auch Folge einer Wechselwirkung von intermediär gebildeten Methoxyfluranradikalen mit Zellbestandteilen in der Niere sein (Schmid, 1982 b).

In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, daß Benedetto et al. (1981) nachweisen konnten, daß Tetrachlorkohlenstoff (CCl_4) von mikrosomalen Suspensionen aus der Rattenniere zum Trichloromethylradikal ($CCl_3^{\bullet}$) aktiviert wird und im Nierengewebe Lipidperoxidation stimuliert.

Das Vorkommen mischfunktioneller Oxygenasen in der Niere ist bekannt (Burke und Orrenius, 1979; McCormack et al., 1979). Deshalb verwundert es nicht, daß Van Dyke und Chenoweth (1965) feststellten, daß Methoxyfluran in vitro auch von Nierengewebe dechloriert wird. Man wird nicht ausschließen können, daß Methoxyfluran durch dieses Enzymsystem in der Niere auch zu Radikalen biotransformiert wird.

Borona et al. (1979) konnten zeigen, daß sowohl Methoxyfluran als auch Fluoridionen die Ribonucleinsäuresynthese in der Niere hemmen, sich jedoch im Inhibitionsmuster und dadurch unterscheiden, daß nach Methoxyfluran eine längerdauernde Inhibition eintritt. Dieses Phänomen ließe sich gut durch eine - im Vergleich zu Fluorid andersartige - Wechselwirkung von Methoxyfluranradikalen mit Zellkomponenten erklären.

Schließlich ist eine radikalinduzierte Schädigung der Niere im Rahmen der Verstoffwechslung von Methoxyfluran dadurch vorstellbar, daß (organische) Methoxyfluranmetaboliten in Form wasserlöslicher Konjugate (z. B. mit Mercapturoder Glucuronsäure) in die Niere gelangen und dort frei sowie zu Radikalen umgesetzt werden (Schmid, 1982 b).

4.4.2.2 Hepatotoxizität

Klinik und pathologische Anatomie. Beim Menschen haben Leberfunktionstests eine vorübergehende, mäßige Beeinflussung des Organs ergeben, die jedoch teilweise schon bei relativ niedrigen Methoxyflurandosen nachweisbar war (Little und Wetstone, 1964; Dahlgren und Goodrich, 1976).

Es sind aber auch Fälle bekannt, in denen sich nach einer Methoxyflurannarkose eine massive L e b e r n e k r o s e entwickelte, wobei Regeneration (Klein und Jeffries, 1966; Joshi und Conn, 1974; Rubinger et al., 1975) oder Tod die Folge waren (Durkin et al., 1966; Lischner et al., 1967; Elkington et al., 1968; Becker, 1970; Stefanini et al., 1970; Judson et al., 1971; Holden und Sherline, 1972; Min et al., 1977). Lebernekrosen nach Methoxyfluran zeigen oft ein c e n t r i l o b u l ä r e s Verteilungsmuster

und gleichen den von Halothan verursachten Leberschädigungen (Klein und Jeffries, 1966; Lischner et al., 1967; Elkington et al., 1968; Zimmerman, 1974; Rubin, 1980).

Nach Coultas et al. (1969) ist Methoxyfluran beim Hund im Vergleich zu Halothan das stärkere Hepatotoxin.

Cale et al. (1962) setzten hypovolämische Hunde einer Überdosis Methoxyfluran unter hypoxischen Bedingungen aus und interpretierten die danach beobachtete feine wässrige Vakuolisierung des centrilobulären Leberparenchyms als "reversiblen und unspezifischen Prozeß", wohingegen Giesecke et al. (1966) mäßige bis schwere histologische Veränderungen der Leber bei Hunden im Hungerzustand nach Methoxyfluranüberdosierung feststellten. In diesem Zusammenhang ist interessant, daß im Hungerzustand die Aktivität der mischfunktionellen Oxygenasen gesteigert ist, da ihr physiologischer Abbau verlangsamt ist (Greim, 1975).

Darüberhinaus sind Fälle beschrieben, in denen sich bei Mensch (Elkington et al., 1968; Blettery et al., 1972; Kalkay, 1977) und Hund (Ndiritu und Weigel, 1977) neben Leber- auch gleichzeitig Nierenschäden im Anschluß an Methoxyflurannarkosen entwickelten.

Ätiologie und Pathogenese. Die Hepatotoxizität von Methoxyfluran soll mit der Metabolisierung des Inhalationsanästhetikums in Zusammenhang stehen (Giesecke et al., 1966; Dahlgren und Goodrich, 1976; Cohen, 1978; Stacey et al., 1978; Rubin, 1980).

Oftmals entwickelte sich die Leberschädigung nach wiederholter Exposition (Becker, 1970; Stefanini et al., 1970; Rubinger et al., 1975), nach Abusus (Min et al., 1977) sowie in einigen Fällen, nachdem eine Halothannarkose vorausgegangen bzw. nachgefolgt war (Lindenbaum und Leifer, 1963; Joshi und Conn, 1974). Diese Umstände sowie eine häufiger nachzuweisende Eosinophilie (Klein und Jeffries, 1966; Lischner et al., 1967; Judson et al., 1971) lassen einige Autoren auf eine H y p e r s e n s i t i v i t ä t - ggf. mit Kreuzsensibilisierung Halothan/Methoxyfluran - als pathogenetischen Mechanismus schließen (Elkington et al., 1968; Stefanini et al., 1970; Judson et al., 1971; Joshi und

Conn, 1974; Rubinger et al., 1975; Cohen, 1978).

Andererseits wurde in vitro mehrfach gezeigt, daß sich die zytotoxische Wirkung von Methoxyfluran auf Leberzellen hauptsächlich in M e m b r a n s c h ä d e n äußert (Goto et al., 1976; Salhab et al., 1978; Stacey et al., 1978), wofür nach Stacey et al. (1978) vor allem die Bildung toxischer Metaboliten in Frage kommt.

Eine endgültige Abklärung der Ursache(n) methoxyfluranbedingter Leberschäden steht derzeit also noch aus; jedoch kann eine Beteiligung von in der Leber gebildeten Methoxyfluran r a d i k a l e n nicht ausgeschlossen werden:

Da die halogenierten Inhalationsanästhetika als einfache, wenig reaktive Moleküle selbst keine Antigenwirkung haben können, setzt ein Leberschaden auf allergischer Basis, den man sich als Folge einer Reaktion von T-Lymphozyten mit membrangebundenen Antigenen vorstellt, eine Biotransformation dieser Inhalationsanästhetika zu reaktiven Metaboliten (Radikalen ?) voraus, die stabile Bindungen mit Proteinen und anderen Makromolekülen eingehen können (Cohen, 1978).

Nach Sweeney (1981) muß im relativ sauerstoffärmeren centrilobulären Bereich des Leberläppchens mit einem Überwiegen reduktiver Metabolisierungsreaktionen, also ggf. auch mit einer vermehrten Radikalbildung bei reduktiver Dehalogenierung von Methoxyfluran, gerechnet werden. Ein centrilobuläres Verteilungsmuster der Leberschädigungen nach Methoxyfluranexposition könnte demnach auf eine radikalbedingte Ursache schließen lassen.

Die in vitro durch Methoxyfluran verursachten Membranschäden bei Hepatozyten könnten die Folge einer peroxidativen Schädigung von Membranlipiden sein, welche ihrerseits durch die Entstehung von radikalischen Metaboliten des Inhalationsanästhetikums bedingt sein könnte.

4.4.2.3 Mutagenität, kanzerogenität, Teratogenität

Nach Untersuchungen in vitro ist Methoxyfluran nicht mutagen (Baden et al., 1977; White et al., 1979 b) und stellt in vivo auch keine signifikante Bedrohung bezüglich seiner

Kanzerogenität dar (Eger II et al., 1978).

Kusyk und Hsu (1976) berichten jedoch über mitotische Anomalien bei Säugerzellen in vitro und bei aviären Zellen in vivo, die durch Methoxyfluran hervorgerufen werden.

Fink und Kenny (1968) stellten fest, daß Methoxyfluran die Multiplikationsrate von heteroploiden Zellkulturen herabsetzt.

Auch Hack et al. (1981) beobachteten eine dosisabhängige Hemmung der Zellvermehrung in vitro. Darüberhinaus erzeugte Methoxyfluran zytotoxische Effekte und einen Abfall des zellulären Protein- und Desoxyribonucleinsäure-Gehaltes.

Wurden gravide Ratten vom 6. bis zum 15. Graviditätstag jeweils 4 Stunden täglich Methoxyfluran in anästhetischen Konzentrationen ausgesetzt, zeigten deren Foeten Gewichtsverminderung, verringerte Ossifikation und verzögerte Entwicklung der Niere (!) (Wharton et al., 1980).

III EIGENE UNTERSUCHUNGEN

1 Experimentelle Problemstellung

In der vorliegenden Arbeit ist experimentell untersucht worden, ob Methoxyfluran i n v i v o zu Radikalen metabolisiert wird, und wie eine Radikalbildung ggf. durch Enzyminduktion mit Phenobarbital, durch Enzymhemmung mit Piperonylbutoxid sowie durch einen unterschiedlichen Sauerstoffgehalt der Inspirationsluft beeinflußt wird.

Zum Nachweis einer Radikalbildung aus Methoxyfluran sind folgende, als Indikatoren für radikalgeschädigte Membranlipide (Lipidperoxidation) geltende Parameter (siehe Abschnitt 2 der Literaturübersicht) bei methoxyfluranbelasteten Versuchstieren erfaßt worden:

a) Die Äthan- und die Äthenkonzentration in der Exspirationsluft durch gaschromatographische Analyse und
b) die Bildung von Malondialdehyd in der Leber anhand seiner Pigmentbildung mit Thiobarbitursäure.

2 Versuchsplan

Eine Übersicht über die durchgeführten Versuche, die dabei eingesetzte Anzahl von Versuchstieren sowie die erfaßten Untersuchungsparameter gibt Tabelle 3.

Tab. 3: Versuchsübersicht, Versuchstierzahlen (V) und Untersuchungsparameter

Versuch	V	Parameter		
		C_2H_6	C_2H_4	MDA
Blindversuche ohne Versuchstiere				
Referenzgase in synthetischer Luft	0	+	+	-
Methoxyfluran in synthetischer Luft	0	+	+	-
Kontrollversuche mit Versuchstieren				
a) in synthetischer Luft				
Keine Behandlung	32	+	+	+
Applikation von Paraffin	32	+	+	+
Applikation von Phenobarbital vor Paraffin	24	+	+	+

Fortsetzung von Tab. 3:

Versuch	V	Parameter		
		C_2H_6	C_2H_4	MDA
Applikation von Piperonylbutoxid vor Paraffin	24	+	+	+
b) in synthetischer Luft mit verschiedenem Sauerstoffgehalt				
Applikation von Paraffin	48	+	+	+
Testversuche mit Versuchstieren				
a) in synthetischer Luft				
Applikation von Methoxyfluran	192	+	+	+
Applikation von Phenobarbital vor Methoxyfluran	144	+	+	+
Applikation von Piperonylbutoxid vor Methoxyfluran	144	+	+	+
b) in synthetischer Luft mit verschiedenem Sauerstoffgehalt				
Applikation von Methoxyfluran	288	+	+	+

MDA: Malondialdehyd; +: untersucht; -: nicht untersucht

3 Versuchstiere, Versuchstierhaltung und -fütterung

Als Versuchstiere dienten konventionell gehaltene männliche und weibliche weiße Mäuse aus der Zucht des Instituts mit einer durchschnittlichen Körpermasse von 31 Gramm. Bis zum Versuchsbeginn erhielten die Versuchstiere die Ratten- und Mäuse-Haltungsdiät H 1003 der Fa. ALMA-Futter Botzenhardt KG, Kempten/Allgäu, sowie aqua font. ad libitum. Der Hersteller macht über die Diät folgende Angaben:

Zusammensetzung (Masse% in der Diät)	
Mais	26,0
Sojaschrot, extr.	20,0
Maisarin	20,0
Weizen	16,0

Fischmehl	6,0
Dorschmehl	2,0
Melasse	2,0
Mineralstoffmischung	2,0
Vitamin-Vormischung	2,0
Magermilchpulver	1,5
Futterfett	1,5
Futterhefe	1,0

Umsetzbare Energie 11 360 Joule/kg Diät

Rohnährstoffe (Masse% in der Diät)

Rohprotein	20,0
Rohasche	7,0
Rohfaser	5,0
Rohfett	4,0

(über Wasser und N-freie Extraktstoffe macht der Hersteller keine Angaben)

Mineralstoffe (g/kg Diät)

Calcium	10,0
Phosphor	7,4
Natrium	5,1
Magnesium	2,4
Kalium	9,3

Spurenelemente-Zusatz (mg/kg Diät)

Eisen	50
Mangan	50
Zink	12
Kupfer	5
Jod	0,2

Vitamin-Zusätze (mg/kg Diät, wenn nicht anders angegeben)

Vitamin A	15 000	I.E.
Vitamin D_3	500	I.E.
Vitamin E	150	
Vitamin K_3	10	
Vitamin B_1	10	

Vitamin B_2	20	
Vitamin B_6	15	
Vitamin B_{12}	30	mcg
Ca-D-Pantothenat	50	
Nicotinsäure	50	
Cholin	1 000	
Folsäure	5	
Biotin	60	mcg
Vitamin C	50	

Aminosäuren (g Aminosäure/100 g Rohprotein)	
Lysin	6,1
Lysin, verfügbar	2,8
Methionin + Cystein[1)]	4,2
Phenylalanin + Tyrosin[2)]	9,0
Arginin	6,8
Histidin	2,4
Tryptophan	1,3
Isoleucin	4,7
Leucin	9,4
Valin	5,2

1) 50 % als Methionin

2) 60 % als Phenylalanin

4 Untersuchungsmethodik

4.1 Chemikalien und Gase

Folgende Chemikalien und Gase kamen bei der Durchführung der eigenen Untersuchungen zur Verwendung:

a) Methoxyfluran als Penthrane$^{(R)}$ ($CHCl_2CF_2OCH_3$)
DEUTSCHE ABBOTT, Wiesbaden

b) Paraffin flüssig
MERCK, Darmstadt

c) Referenzgase:
Methan (CH_4), Äthan (C_2H_6), Propan (C_3H_8), n-Butan (C_4H_{10}), Äthen (C_2H_4), Propen (C_3H_6), cis-2-Buten und trans-2-Buten (C_4H_8), je 100 µl/l (vpm) Stickstoff (N_2)
LINDE, Unterschleißheim

d) Atem- und Betriebsgase:
Sauerstoff (O_2), 99,995 Vol%
Stickstoff (N_2), nachgereinigt, 99,9995 Vol%
Wasserstoff (H_2), 99,999 Vol%
Synthetische Luft (20 Vol% O_2 und 80 Vol% N_2) mit einem Kohlenwasserstoffanteil < 5 vpm
LINDE, Unterschleißheim

e) Atemkalk als Dräger Sorb 800$^{(R)}$, vor Versuchsbeginn 1 Stunde lang auf 100 °C erhitzt
DRÄGERWERKE, Lübeck

f) Trichloressigsäure (CCl_3COOH) pro analysi
Verwendung als 70 %ige wässerige Lösung (Masse/Volumen)
MERCK, Darmstadt

g) 2-Thiobarbitursäure ($C_4H_4N_2O_2S \cdot H_2O$), Reagenz auf Sorbinsäure
Verwendung als 0,8 %ige wässerige Lösung (Masse/Volumen)
MERCK, Darmstadt

h) n-Hexan (C_6H_{14}) pro analysi
MERCK, Darmstadt

i) Malondialdehyd-bis-(diäthylacetal) ($C_{11}H_{24}O_4$) zur Synthese
MERCK-SCHUCHARDT, Hohenbrunn

j) Natriumchlorid krist. (NaCl) pro analysi
Verwendung als 0,9 %ige wässerige Lösung (Masse/Volumen)
MERCK, Darmstadt

k) Eisen(II)-sulfat ($FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$) pro analysi
Verwendung als 0,278 %ige wässerige Lösung (Masse/Volumen)
MERCK, Darmstadt

1) Phenobarbital ($C_{12}H_{12}N_2O_3$) als Luminal$^{(R)}$-Ampullen
200 mg/ml Lösungsmittel aus 1,2-Propylenglykol, Äthanol und aqua dest. (Herstellerangaben)
BAYER, Leverkusen und MERCK, Darmstadt

m) Piperonylbutoxid ($C_{19}H_{30}O_5$) 99 % pro analysi
SERVA FEINBIOCHEMICA, Heidelberg

4.2 Versuchsdurchführung

4.2.1 Applikation und Dosierung der Wirkstoffe

Alle Wirkstoffe wurden den Versuchstieren als frisch zubereitete Lösungen verabreicht, wobei das Applikationsvolumen stets 5 ml/kg Körpermasse betrug.

Methoxyfluran wurde immer unmittelbar vor Versuchsbeginn in flüssigem Paraffin gelöst und intraperitoneal verabreicht. Es wurde stets das gleiche Dosierschema mit 6 Methoxyflurandosen zwischen 209,3 und 837,0 mg/kg Körpermasse angewendet.

Zur Induktion der mischfunktionellen Oxygenasen erhielten die Versuchstiere Phenobarbital an 3 Tagen vor Versuchsbeginn in einer Tagesdosis von 20 mg/kg Körpermasse intraperitoneal appliziert, wozu das als Luminal$^{(R)}$ bereits in Lösung vorliegende Phenobarbital mit aqua dest. weiterverdünnt wurde.

Zur Hemmung der genannten Enzymsysteme wurde den Versuchstieren Piperonylbutoxid in einer Einzeldosis von 400 mg/kg Körpermasse als Lösung in Paraffin 2 Stunden vor Versuchsbeginn subcutan injiziert.

4.2.2 Gewinnung der Exspirationsluft und der Leberproben

Die Tierversuche wurden mit Versuchstiergruppen durchgeführt, von denen jede aus 4 gleichgeschlechtlichen Mäusen bestand. Nachdem diese dem Versuchszweck entsprechend behandelt worden waren, wurden sie in einen gasdichten Exsik-

kator aus Glas zur Gewinnung der Exspirationsluft verbracht. In diesem Exsikkator (Leervolumen 865 ml) saßen die Versuchstiere auf einem Drahtnetz über 100 Gramm Atemkalk (zur Kohlendioxydabsorption). Das Nettovolumen eines beschickten Exsikkators (Leervolumen minus Volumen von Versuchstieren, Atemkalk und Drahtnetz) betrug - in Abhängigkeit von der Körpermasse der Versuchstiere - ca. 640 ml.

Der versuchsfertige, mit Mäusen besetzte Exsikkator wurde nun, je nach Art des Versuches, 5 Minuten lang mit synthetischer Luft, reinem Sauerstoff oder einem zuvor in einem Gasometer hergestellten Gasgemisch gespült. Die Anreicherung der Exspirationsluft wurde dann mit dem Anschluß an eine reine Sauerstoffversorgung (kontinuierlicher, druckloser Ersatz des von den Versuchstieren absorbierten Sauerstoffs über ein Sperrventil) begonnen (Versuchszeitpunkt 0).

Nach einer Anreicherungsdauer von 180 Minuten wurde mit einer Gasspritze (HAMILTON, Darmstadt) über ein Silikongummiseptum eine Probe des Exsikkatorgases (10 ml Probenvolumen) entnommen.

Die Versuchstiere wurden bei Versuchsende mit Stickstoff betäubt, dekapitiert und entblutet. Dann wurde die Leber entnommen, von Gefäßversorgung, Gallenblase und Gallengang getrennt, 3 mal in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und an Filterpapier abgetrocknet.

4.2.3 Kohlenwasserstoffbestimmung

Von der entnommenen Probe des Exsikkatorgases wurden schließlich 3 ml zur Bestimmung ihres Gehaltes an Äthan und Äthen analysiert.

Hierzu diente ein Gaschromatograph der Fa. CARLO ERBA STRUMENTAZIONE, Rodano (Milano), Modell Fractovap 4 100, unter Verwendung eines Flammenionisationsdetektors, der mit Wasserstoff und synthetischer Luft betrieben wurde.

Als Trennsäule diente eine 5 Meter lange Stahlsäule mit einer Füllung von 2 % Carbowax auf Porasil C mit einer Korngröße von 80 bis 100 mesh. Trägergas war nachgereinig-

ter Stickstoff mit einer Flußgeschwindigkeit von 30 ml pro Minute.

Die Arbeitstemperaturen betrugen beim Einspritzblock 50 °C, bei der Säule 50 °C und beim Detektor 120 °C.

Die Kohlenwasserstoffe der Gasproben wurden von einem an den Gaschromatographen angeschlossenen Schreiber des Fabrikats Servogor der Fa. BBC GOERZ, Österreich, als Peaks aufgezeichnet, deren Höhe als Konzentrationsparameter verwendet wurde (Schreibereinstellungen: Spannung 2 mV, Papiervorschub 1 cm pro Minute).

4.2.4 Malondialdehydbestimmung

Zur Bestimmung des in der Leber gebildeten Malondialdehyds (nach Terao und Matsushita, 1981) wurden von den vorbereiteten Lebern aller Mäuse einer Versuchsgruppe je 0,5 Gramm entnommen, mit 2,0 ml Thiobarbitursäurelösung versetzt und bei ca. 15 000 U/min 60 Sekunden lang homogenisiert (Ultra-Turrax).

Anschließend wurden 0,5 Gramm Leberhomogenat mit 2,0 ml Thiobarbitursäurelösung, 2,0 ml Trichloressigsäurelösung und 1,0 ml Eisensulfatlösung (entsprechend 10 µmol $FeSO_4$ pro Ansatz) versetzt, 30 Minuten lang im siedenden Wasserbad unter Rückfluß erhitzt, nach Abkühlung auf Zimmertemperatur mit 5 ml n-Hexan ausgeschüttelt und zur Abscheidung des organischen Überstandes 6 Minuten lang bei 6 000 U/min zentrifugiert.

Nach Absaugen des Überstandes mittels Wasserstrahlpumpe wurde die Extinktion der klaren, wässerigen Phase bei 535 nm (aldehydspezifisch) und einer Schichtdicke von 1 cm bestimmt.

5 Versuchsauswertung

Die Bestimmung des Athan- und Äthengehaltes im Exsikkatorgas (also der angereicherten Exspirationsluft der Versuchstiere) erfolgte qualitativ und quantitativ, der Malondialdehydnachweis in der Leber quantitativ.

5.1 Kohlenwasserstoffberechnung

Qualitative Auswertung. Zur Identifizierung von Äthan und Äthen in den Chromatogrammen der Exsikkatorgasproben wurden die Retentionszeiten der entsprechenden Peaks und deren Vergrößerung durch Zumischung von Äthan und Äthen (Referenzgase) herangezogen (spiking).

Quantitative Auswertung. Die in den Exsikkatorgas-Chromatogrammen als Äthan bzw. Äthen identifizierten Kohlenwasserstoffpeaks wurden anhand von Eichkurven quantifiziert.

Bei der experimentellen Ermittlung dieser Eichkurven durch Zumischung von Referenzgasen zu synthetischer Luft ergab sich in allen Fällen ein linearer Zusammenhang zwischen Kohlenwasserstoffkonzentration und Paekhöhe der allgemeinen Form:

$$P = a + bC \quad (cm)$$

wobei die verwendeten Symbole folgende Bedeutung haben:

P: Peakhöhe in cm

C: Kohlenwasserstoffkonzentration in µl/l (vpm)

a,b: stoffspezififsche Konstanten (Regressionskoeffizienten).

Die experimentell bestimmten Regressionskoeffizienten (a, b), die Korrelationskoeffizienten (r) für den Zusammenhang zwischen Peakhöhe und Kohlenwasserstoffkonzentration und die statistische Beurteilung der Korrelationskoeffizienten gehen aus Tabelle 4 hervor.

Tab. 4: Eichkurvenparameter für Äthan und Äthen (n = 5)

Kohlenwasserstoff	Regression		Korrelation	
	a	b	r	p <
Äthan	0,9632	91,0620	0,9985	0,001
Äthen	- 0,1725	83,9405	0,9980	0,001

Die Eichkurven für Äthan bzw. Äthen sind in den Abbildungen 1 bzw. 2 graphisch dargestellt.

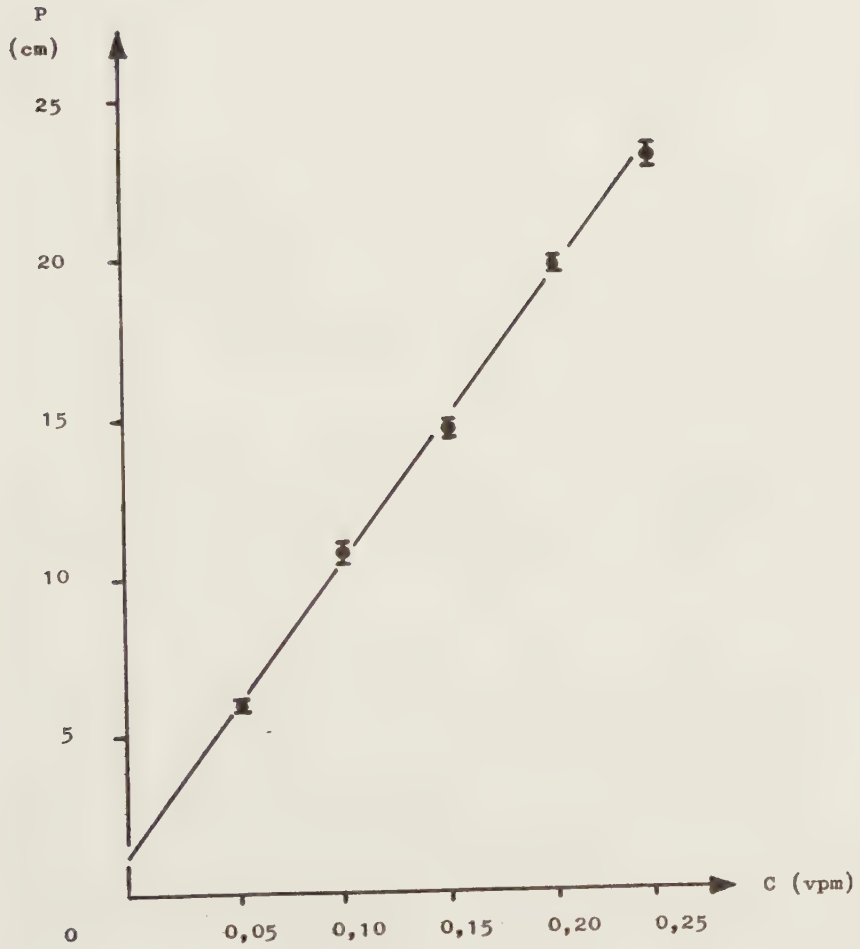


Abb. 1: Eichkurve für Äthan ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

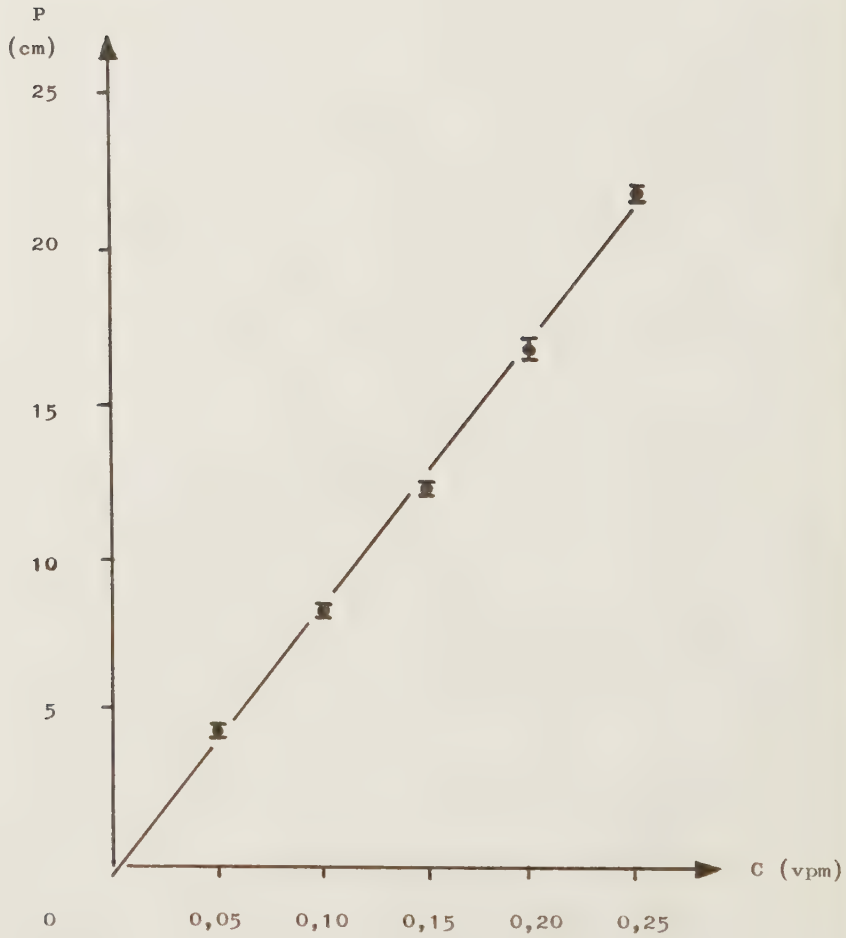


Abb. 2: Eichkurve für Äthen ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Unter Verwendung der Regressionen aus Tabelle 4 ist die im Laufe der dreistündigen Versuchstierexposition im Exsikkator angereicherte Äthan- bzw. Äthenmenge wie folgt berechnet worden (Schmid, 1982 b):

$$M = \frac{44{,}64 \cdot (P - a) \cdot V}{b \cdot KM} \qquad (nmol/kg \cdot t)$$

mit nachstehender Bedeutung der verwendeten Symbole:

M: Kohlenwasserstoffmenge (nmol/kg · t)
a,b: Regressionskoeffizienten (Tab. 4)
P: Peakhöhe (cm)
KM: Körpermasse der Versuchstiergruppe (g)
V: Nettovolumen des Exsikkators (ml)
t: Expositionsdauer der Versuchstiere im Exsikkator (min)

5.2 Malondialdehydberechnung

Zur Berechnung des in der Versuchstierleber gebildeten Malondialdehyds aus den nach 4.2.4 gewonnenen Extinktionen ist eine Eichkurve der allgemeinen Form

$$E = a + bC$$

herangezogen worden, wobei E die bei 535 nm und einer Schichtdicke von 1 cm gemessene Extinktion, C die Malondialdehydkonzentration in nmol/5,5 ml sowie a und b pigmentspezifische Regressionskoeffizienten symbolisieren. Einer experimentellen Ermittlung der Eichkurvenparameter unter Verwendung von Malondialdehyd-bis-(diäthylacetal) zufolge hat a den Wert 0,1123 und b den Wert 0,0280; der lineare Zusammenhang zwischen Extinktion und Malondialdehydkonzentration ist statistisch gut abgesichert (Korrelationskoeffizient $r = 0{,}9969$ mit $p < 0{,}001$).

In die Berechnung der Malondialdehydkonzentration in der Versuchstierleber nach dreistündiger Versuchsdauer gehen die pigmentspezifischen Regressionskoeffizienten wie folgt ein (Beuter, 1982 b):

$$C_{Le} = \frac{4 \cdot (E - a)}{b} \qquad (nmol/g)$$

wobei die verwendeten Symbole folgende Bedeutung haben:

a,b: pigmentspezifische Regressionskoeffizienten

E: Extinktion bei 535 nm und 1 cm Schichtdicke

C_{Le}: Malondialdehydkonzentration in der Leber (nmol/g)

5.3 Statistische Beurteilung

5.3.1 Flächenberechnung

Die statistische Differenzierung der Versuchswerte wurde mittels Berechnung folgender Flächen durchgeführt (Schmid, 1982 b):

a) der Dosis-Wirkungsfläche, die als Fläche unter einer Dosis-Wirkungskurve definiert wird,

b) der Kontrollfläche, die sich als Produkt aus Kontrollwert und Maximaldosis errechnet, und

c) der Wirkungsfläche, die man durch Subtraktion der Kontroll- von der Dosis-Wirkungsfläche erhält.

Zur Veranschaulichung sind diese Flächen in Abbildung 3 graphisch dargestellt.

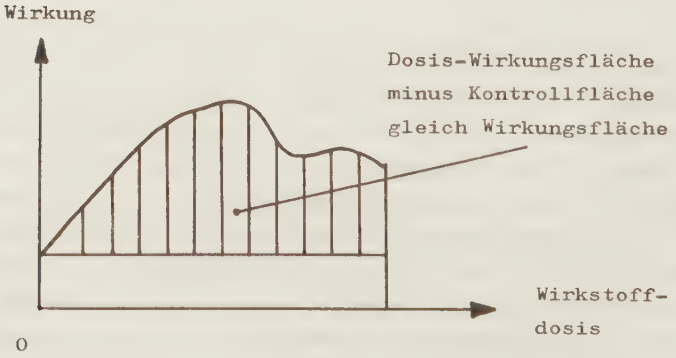


Abb. 3: Graphische Darstellung von Dosis-Wirkungs-, Kontroll- und Wirkungsfläche (modifiziert nach Beuter und Schmid, 1982)

5.3.2 Flächenvergleich und statistische Beurteilung

Zur statistischen Differenzierung der erwähnten Flächen wurde unterstellt, daß die experimentell gewonnenen Stichproben mit gleicher Varianz normalverteilt sind.

Vergleich von Dosis-Wirkungs- mit Kontrollflächen. Der arithmetische Mittelwert von n Dosis-Wirkungsflächen ($\bar{x}_1$) ist dann mit definierter Irrtumswahrscheinlichkeit (p) signifikant von dem arithmetischen Mittelwert der gleichen Anzahl n entsprechender Kontrollflächen ($\bar{x}_2$) verschieden, wenn eine mittels den Spannweiten der Dosis-Wirkungs- bzw. der Kontrollflächen (R_1 bzw. R_2) berechnete Prüfgröße u_b nach LORD einen tabellierten Schrankenwert u_t erreicht oder überschreitet. Die genannte Prüfgröße berechnet sich nach folgender Formel (modifiziert nach Sachs, 1978):

$$u_b = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{(R_1 + R_2)/2}$$

Vergleich von Wirkungsflächen verschiedener Behandlungen. Die arithmetischen Mittelwerte der Wirkungsflächen zweier verschiedener Behandlungen ($\bar{x}_1$ bzw. $\bar{x}_2$) wurden anhand der oberen Vertrauensgrenzen (V_{o1} bzw. V_{o2}) ihrer Spannweiten (R_1 bzw. R_2) statistisch differenziert.

Eine gesicherte Unterscheidung zwischen $\bar{x}_1$ und $\bar{x}_2$ mit definierter Irrtumswahrscheinlichkeit (p) ist dann gegeben, wenn folgende Ungleichung zutrifft (Schmid, 1982 b):

$$(\bar{x}_2 - 0{,}5\ V_{o2}) > (\bar{x}_1 + 0{,}5\ V_{o1}) \quad \text{mit}$$

$$V_{o1} = a_1 b_1 R_1 \quad \text{bzw.} \quad V_{o2} = a_2 b_2 R_2$$

wobei a_1 bzw. a_2 Faktoren für die Schätzung der Standardabweichung der Grundgesamtheit aus der Spannweite, b_1 bzw. b_2 Faktoren zur Schätzung eines Vertrauensbereiches um die Spannweite symbolisieren (Sachs, 1978).

6 Ergebnisse

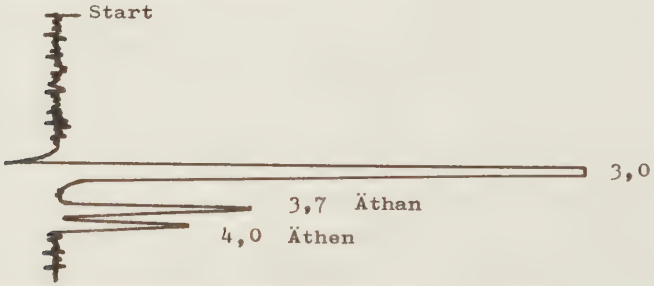
Auf die oben beschriebene Weise sind durch eigene experimentelle Untersuchungen folgende Ergebnisse gewonnen worden:

6.1 Blindversuche ohne Versuchstiere

Die Blindversuche ohne Versuchstiere dienten der Absicherung der Kohlenwasserstoffbestimmung und wurden mit versuchsfertigem, mit Atemkalk beschicktem Exsikkator durchgeführt.

6.1.1 Blindversuch mit Referenzgasen in synthetischer Luft

Zur Ermittlung der Retentionszeiten von Äthan bzw. Äthen wurde im Exsikkator ein Gemisch aus synthetischer Luft und den beiden Kohlenwasserstoffen so hergestellt, daß letztere in einer Konzentration von je 0,05 vpm darin enthalten waren. Das Chromatogramm einer Probe dieses Gasgemisches zeigt die Abbildung 4.



Retentionszeit (min)	Peak
3,0	Sauerstoff, Kohlendioxyd
3,7	Äthan
4,0	Äthen

Abb. 4: Gaschromatogramm von Äthan (0,05 vpm) und Äthen (0,05 vpm) in synthetischer Luft

Das Chromatogramm zeigt, daß die Retentionszeit von Äthan 3,7 Minuten und von Äthen 4,0 Minuten beträgt.

6.1.2 Blindversuch mit Methoxyfluran in synthetischer Luft

Zum Ausschluß einer Äthan- bzw. Äthenbildung bei potentieller Reaktion von Methoxyfluran mit Atemkalk sind 0,12 ml des Inhalationsanästhetikums im versuchsfertigen Exsikkator verdampft worden, nachdem der Atemkalk vorher angefeuchtet worden war. Nach dreistündiger Expositionsdauer wurde das Exsikkatorgas mit dem in Abbildung 5 dargestellten Ergebnis gaschromatographisch untersucht.

Retentionszeit (min)	Peak
3,1	Sauerstoff, Kohlendioxyd

Abb. 5: Gaschromatogramm von Methoxyfluran in synthetischer Luft

Abbildung 5 zeigt, daß aus Methoxyfluran in vitro keiner der gesuchten Kohlenwasserstoffe gebildet wird (vgl. mit Abb. 4).

Dieser Befund steht in Einklang mit der Angabe des Herstellers, daß Methoxyfluran nicht mit Atemkalk reagiert.

6.2 Kontrollversuche mit Versuchstieren

Bei den Kontrollversuchen wurden die Äthan- und Äthenexspiration der Versuchstiere sowie die Malondialdehydbildung in der Versuchstierleber erfaßt.

6.2.1 Kontrollversuche in synthetischer Luft

Die Ergebnisse der Kontrollversuche in synthetischer Luft sind in Tabelle 5 zusammengefaßt.

Tab. 5: Äthan- und Äthenexspiration (nmol/kg·t) sowie Malondialdehydbildung (nmol/g) bei unbehandelten sowie mit Paraffin belasteten Versuchstieren ohne und mit Enzyminduktion bzw. -hemmung; synthetische Luft, t = 180 min

Behandlung	G	n	Parameter					
			Äthan		Äthen		MDA	
			$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$
keine	m	4	3,63	0,21	2,78	0,49	19,4	1,4
Par	m	4	3,80	0,63	2,06	0,12	20,7	2,2
PhB + Par	m	3	3,89	1,10	2,00	0,38	25,1	2,6
PBO + Par	m	3	4,59	0,27	2,01	0,47	16,2	0,9
keine	w	4	3,59	0,63	2,74	0,58	18,4	1,8
Par	w	4	5,34	0,67	4,01	0,62	18,5	2,6
PhB + Par	w	3	3,35	0,31	2,04	0,14	38,7	3,9
PBO + Par	w	3	4,24	0,40	1,75	0,06	18,6	4,2

Die in Tabelle 5 verwendeten Symbole bedeuten:

t: Expositionsdauer der Versuchstiere im Exsikkator
G: Geschlecht der Versuchstiere
m: männlich
w: weiblich

MDA: Malondialdehyd
Par: Paraffin flüssig
PhB: Phenobarbital
PBO: Piperonylbutoxid
n: Stichprobenumfang
$\bar{x}$: arithmetischer Mittelwert
$s_{\bar{x}}$: Standardabweichung von $\bar{x}$

Aus Tabelle 5 geht hervor, daß
- offensichtlich eine spontane Bildung der drei Untersuchungsparameter bei den Versuchstieren erfolgt, auch wenn die Tiere überhaupt nicht behandelt wurden,
- die Paraffinbelastung der Versuchstiere nur bei weiblichen Tieren die Spontanexspiration der Kohlenwasserstoffe leicht erhöht, ansonsten aber die Spontanbildung der Untersuchungsparameter nicht wesentlich beeinflußt,
- die spontane Athan- und Athenexspiration sowie die Malondialdehydbildung in der Leber durch die Induktion der mischfunktionellen Oxygenasen mit Phenobarbital bzw. deren Hemmung mit Piperonylbutoxid beeinflußt werden.

6.2.2 Kontrollversuche in synthetischer Luft mit verschiedenem Sauerstoffgehalt

Die Ergebnisse der Kontrollversuche mit männlichen paraffinbelasteten Versuchstieren zur Eruierung des Einflusses eines verschiedenen Sauerstoffpartialdruckes der Inspirationsluft sind in Tabelle 6 zusammengefaßt. Der mit den Versuchstieren besetzte Exsikkator wurde bei diesen Kontrollversuchen vor Versuchsbeginn mit reinem Sauerstoff (99,99 Vol%) bzw. mit Gasmischungen, bestehend aus Sauerstoff und Stickstoff, gespült.

Die Werte von Tabelle 6 sind der Berechnung der Wirkungsflächen von Tabelle 13 zugrunde gelegt worden.

Tab. 6: Äthan-, Äthen- und Malondialdehydnachweis bei männlichen paraffinbelasteten Versuchstieren; verschiedener Sauerstoffgehalt der Inspirationsluft, t = 180 min und n = 3

Sauerstoffgehalt (Vol%)	Parameter					
	Äthan (nmol/kg·t)		Äthen (nmol/kg·t)		MDA (nmol/g)	
	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$
17,5	4,81	1,06	1,93	0,49	20,4	4,7
22,5	5,77	1,27	2,83	0,30	30,8	2,0
25,0	6,67	1,14	2,49	0,51	20,3	1,6
99,9	5,54	1,09	2,53	0,48	21,5	2,4

Bedeutung der verwendeten Symbole wie bei Tabelle 5

6.3 Testversuche mit Versuchstieren

Bei den Testversuchen sind stets 6 Methoxyflurandosen zwischen 209,3 und 837,0 mg/kg Körpermasse intraperitoneal appliziert worden.

6.3.1 Testversuche in synthetischer Luft

6.3.1.1 Testversuche mit nicht vorbehandelten Versuchstieren

Die bei den Testversuchen in synthetischer Luft mit nicht vorbehandelten Versuchstieren gewonnenen Ergebnisse und deren statistische Beurteilung können den beiden folgenden Tabellen entnommen werden.

Tab. 7: Äthan- und Äthenakkumulation (nmol/kg·t) im Exsikkator sowie Malondialdehydbildung (nmol/g) in der Versuchstierleber nach Methoxyfluran; synthetische Luft, t = 180 min und n = 4

Methoxyflurandosis (mg/kg)	G	Parameter					
		Äthan		Äthen		MDA	
		$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$
209,3	m	6,87	0,74	3,55	0,73	36,1	6,5
313,9	m	10,37	1,55	6,32	0,96	27,4	3,7

Fortsetzung von Tab. 7:

Methoxyfluran-dosis (mg/kg)	G	Parameter					
		Äthan		Äthen		MDA	
		$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$
418,5	m	12,82	2,61	7,46	0,82	33,9	2,5
523,1	m	8,65	0,87	4,98	0,54	31,3	9,2
627,8	m	14,06	2,93	7,58	0,68	51,8	12,2
837,0	m	9,34	0,45	5,85	0,27	37,5	11,6
209,3	w	10,39	2,25	3,77	0,74	23,9	6,0
313,9	w	9,83	0,94	7,71	1,38	19,8	4,1
418,5	w	8,85	0,75	4,34	1,19	23,6	4,4
523,1	w	10,78	0,65	8,81	1,05	16,4	3,1
627,8	w	11,69	1,25	7,33	0,71	12,2	2,7
837,0	w	12,17	0,91	7,87	0,35	16,6	6,1

Bedeutung der verwendeten Symbole wie bei Tabelle 5

Tab. 8: Wirkungsflächen der Äthan- und Äthenakkumulation ($nmol \cdot mg/kg^2 \cdot t$) sowie der Malondialdehydbildung in der Leber ($nmol \cdot mg/g \cdot kg \cdot t$) nach Methoxyfluranbelastung nicht vorbehandelter Versuchstiere; synthetische Luft, t = 180 min und n = 4

G		Parameter		
		Äthan	Äthen	MDA
m	$\bar{x}$	4180**	2816**	12221*
	R	2887 - 6822	1918 - 3518	6390 - 15533
w	$\bar{x}$	3906**	1730*	116
	R	2152 - 6544	801 - 3231	- 2988 - 7853

* bzw. **: mittlere Dosis-Wirkungsfläche größer als mittlere Kontrollfläche mit $p < 0,05$ bzw. $p < 0,01$;
R: Spannweite; Bedeutung der übrigen Symbole wie bei Tabelle 5

Ein Vergleich der Testwerte von Tabelle 7 mit den entsprechenden Kontrollwerten von Tabelle 5 zeigt zunächst, daß eine Methoxyfluranbelastung der Versuchstiere sowohl deren Äthan- und Äthenexspiration als auch ihre Malondialdehydbildung in der Leber erhöht.

Abgesehen davon, ergibt eine qualitative Wertung des Dosis-Wirkungsverlaufes eine mehr oder weniger ausgeprägte unorthodoxe mehrgipflige Charakteristik, die für die Kohlenwasserstoffe in den Abbildungen 6 bis 9 veranschaulicht ist.

Die quantitative Auswertung von Tabelle 7 ist in Tabelle 8 zusammengefaßt. Tabelle 8 enthält die aus Tabelle 7 errechneten Wirkungsflächen (s. Abschnitt 5.3.1) der Kohlenwasserstoffexspiration und der Malondialdehydbildung sowie ihre statistische Beurteilung. Dabei zeigt sich, daß alle drei Untersuchungsparameter durch die Methoxyfluranbelastung der Versuchstiere erhöht werden und daß die Erhöhung, mit Ausnahme der MDA-Bildung in der Leber der weiblichen Mäuse, signifikant ist.

6.3.1.2 Testversuche mit Phenobarbital-vorbehandelten Versuchstieren

Die Ergebnisse der Testversuche mit Enzyminduktion durch Phenobarbitalvorbehandlung sind in Tabelle 9 zusammengefaßt; ihre statistische Beurteilung geht aus Tabelle 10 hervor.

Tab. 9: Äthan- und Äthenakkumulation (nmol/kg.t) sowie Malondialdehydbildung (nmol/g) bei methoxyfluranbelasteten Versuchstieren mit Enyzminduktion; synthetische Luft, t = 180 min und n = 3

Methoxyfluran-dosis (mg/kg)	G	Parameter					
		Äthan		Äthen		MDA	
		$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$
209,3	m	10,63	0,98	3,27	0,10	25,1	4,4
313,9	m	12,57	4,38	4,50	0,35	21,8	5,2
418,5	m,	8,58	0,91	4,88	0,62	18,9	1,9
523,1	m	7,28	2,18	4,26	1,38	17,9	1,9
627,8	m	9,13	0,18	5,77	0,19	9,2	1,5
837,0	m	7,86	0,45	6,42	1,35	18,1	0,9

Fortsetzung von Tab. 9:

Methoxyfluran-dosis (mg/kg)	G	Parameter					
		Äthan		Äthen		MDA	
		$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$
209,3	w	9,43	1,64	4,43	0,76	38,6	2,4
313,9	w	10,42	0,49	5,95	1,07	37,5	3,0
418,5	w	9,20	1,69	4,33	0,58	32,5	1,3
523,1	w	6,28	2,39	4,64	1,08	22,5	5,5
627,8	w	10,49	0,07	5,96	0,14	13,3	3,6
837,0	w	8,83	0,38	6,70	0,46	16,1	1,0

Bedeutung der verwendeten Symbole wie bei Tabelle 5

Tab. 10: Wirkungsflächen der Äthan- und Äthenakkumulation (nmol·mg/kg^2·t) sowie der Malondialdehydbildung in der Leber (nmol·mg/g·kg·t) nach Methoxyfluranbelastung von Versuchstieren mit Enzyminduktion; synthetische Luft, t = 180 min und n = 3

G		Parameter		
		Äthan	Äthen	MDA
m	$\bar{x}$	4051	2053	- 4962*
	R	2743 - 4957	1822 - 2384	- 8048 - 586
w	$\bar{x}$	4303	2395	- 8831
	R	3658 - 4783	2332 - 2449	- 15539 - - 2027

*: mittlere Wirkungsfläche ohne Vorbehandlung größer als mittlere Wirkungsfläche mit Enzyminduktion mit $p < 0,05$;
R: Spannweite; Bedeutung der übrigen Symbole wie bei Tabelle 5

Ein Vergleich der Tabelle 9 mit Tabelle 7 zeigt, daß die Äthanakkumulation durch Enzyminduktion bei niedrigen Methoxyflurandosen stärker erhöht ist, im oberen Dosierungs-

bereich jedoch abfällt. Dies ist in den Abbildungen 6 bzw. 7 graphisch veranschaulicht.

Aus einem Vergleich von Tabelle 10 mit Tabelle 8 geht hervor, daß durch eine Induktion der mischfunktionellen Oxygenasen, d. h. eine stärkere Metabolisierung von Methoxyfluran, die Kohlenwasserstoff exspiration der Versuchstiere in quantitativer Hinsicht unbeeinflußt bleibt, während die Malondialdehydbildung in der Leber mehr (bei männlichen Versuchstieren signifikant mit $p < 0,05$) oder weniger (weibliche Tiere) deutlich erniedrigt ist.

6.3.1.3 Testversuche mit Piperonylbutoxid-vorbehandelten Versuchstieren

Die Ergebnisse der Testversuche mit Versuchstieren, die zur Hemmung der mischfunktionellen Oxygenasen mit Piperonylbutoxid vorbehandelt worden waren, sind in den zwei folgenden Tabellen wiedergegeben.

Tab. 11: Äthan- und Äthenakkumulation (nmol/kg·t) sowie Malondialdehydbildung (nmol/g) bei methoxyfluranbelasteten Versuchstieren mit Enzymhemmung; synthetische Luft, t = 180 min und n = 3

Methoxyfluran-dosis (mg/kg)	G	Parameter					
		Äthan		Äthen		MDA	
		$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$
209,3	m	8,53	1,08	3,72	0,37	15,9	1,6
313,9	m	17,27	0,67	6,41	0,49	13,6	0,4
418,5	m	11,03	0,38	6,44	0,33	20,9	2,4
523,1	m	17,87	2,51	9,04	0,16	15,8	2,4
627,8	m	15,15	0,43	9,94	0,43	14,8	0,9
837,0	m	9,01	0,51	5,71	0,20	13,8	2,1

Fortsetzung von Tab. 11:

Methoxyfluran-dosis (mg/kg)	G	Parameter					
		Äthan		Äthen		MDA	
		$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$
209,3	w	9,77	0,32	5,40	1,03	23,7	4,4
313,9	w	15,32	1,00	5,23	0,59	20,3	2,0
418,5	w	7,99	1,35	3,33	0,76	13,7	1,4
523,1	w	6,16	1,38	3,30	0,66	19,6	0,8
627,8	w	11,46	1,02	7,26	0,43	13,7	2,1
837,0	w	12,56	0,80	5,08	1,12	16,7	0,8

Bedeutung der verwendeten Symbole wie bei Tabelle 5

Tab. 12: Wirkungsflächen der Äthan- und Äthenakkumulation (nmol·mg/kg^2·t) sowie der Malondialdehydbildung in der Leber (nmol·mg/g·kg·t) nach Methoxyfluranbelastung von Versuchstieren mit Enzymhemmung; synthetische Luft, t = 180 min und n = 3

G		Parameter		
		Äthan	Äthen	MDA
m	$\bar{x}$	6129	3561	- 360*
	R	5522 - 6928	3013 - 4244	- 1973 - 801
w	$\bar{x}$	4636	2473	- 407
	R	4015 - 4984	2113 - 2562	- 5454 - 2732

*: mittlere Wirkungsfläche ohne Vorbehandlung größer als mittlere Wirkungsfläche mit Enzymhemmung mit $p < 0,05$;
R: Spannweite; Bedeutung der übrigen Symbole wie bei Tab. 5

Die bei Enzymhemmung eingetretenen Veränderungen der Äthanakkumulation in Abhängigkeit von der Methoxyflurandosis sind in den Abbildungen 6 und 7 graphisch veranschaulicht. Aus Abbildung 6 geht zunächst hervor, daß die Dosis-Wir-

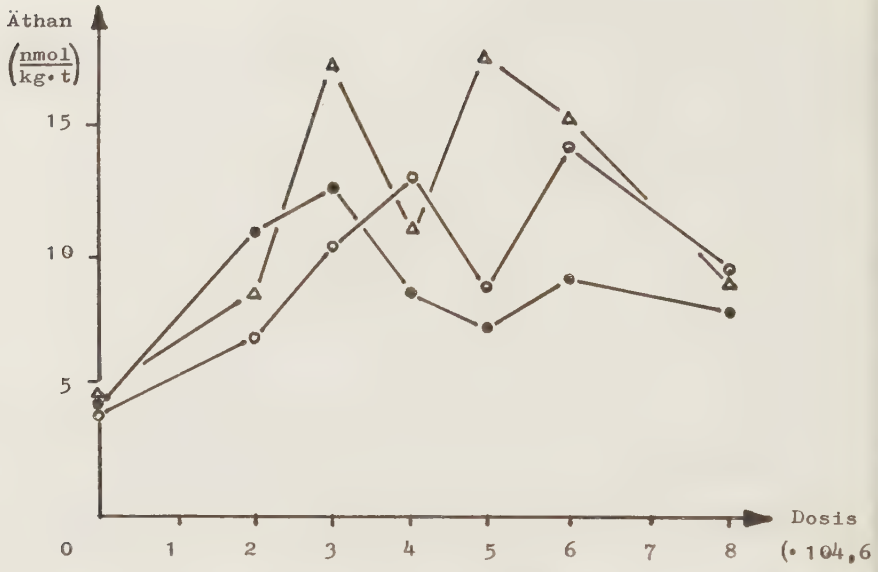


Abb. 6: Äthanakkumulation nach Methoxyfluran ohne (o) und mit Enzyminduktion (•) bzw. -hemmung (Δ), männliche Versuchstiere

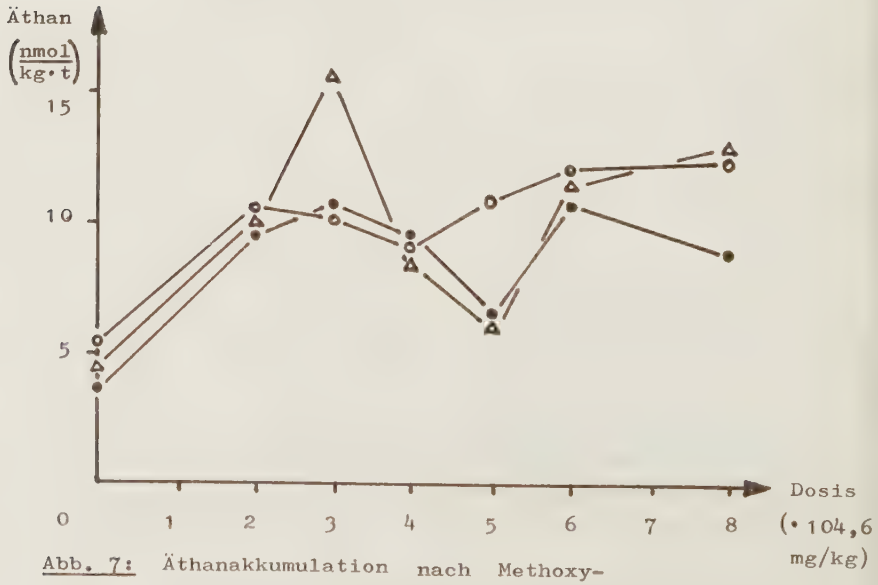


Abb. 7: Äthanakkumulation nach Methoxyfluran ohne (o) und mit Enzyminduktion (•) bzw. -hemmung (Δ), weibliche Versuchstiere

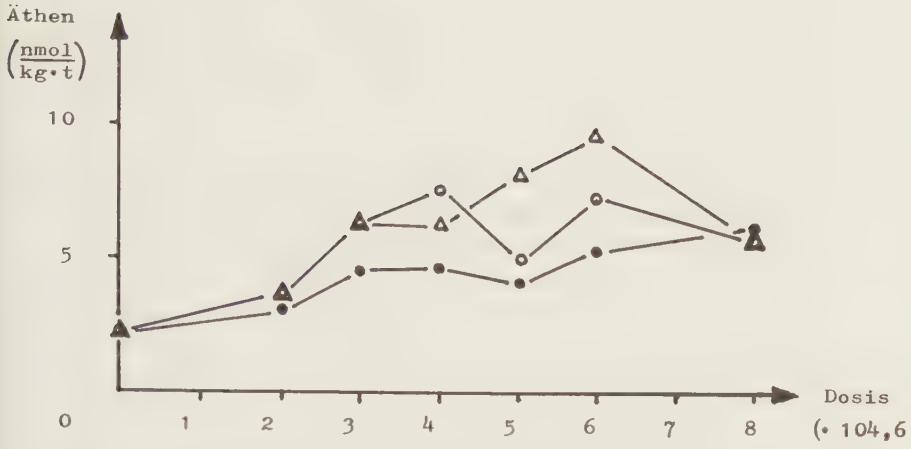


Abb. 8: Äthenakkumulation nach Methoxyfluran ohne (●) und mit Enzyminduktion (●) bzw. -hemmung (△), männliche Versuchstiere

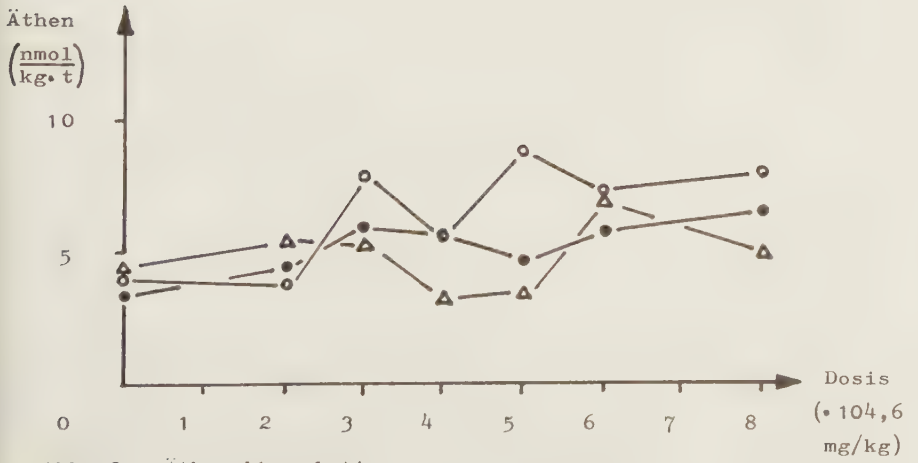


Abb. 9: Äthenakkumulation nach Methoxyfluran ohne (○) und mit Enzyminduktion (●) bzw. -hemmung (△), weibliche Versuchstiere

kungskurve bei männlichen Versuchstieren durch eine Enzymhemmung nach links verschoben wird bei gleichzeitiger Erhöhung der "Gipfel". Aus Abbildung 7 ist ersichtlich, daß bei weiblichen Versuchstieren nach einer Enzymhemmung eine zweigipflige Verlaufsform der Dosis-Wirkungskurve mit deutlichem Abfall im mittleren Dosisbereich zu verzeichnen ist.

Ein Vergleich von Tabelle 12 mit Tabelle 8 zeigt, daß bei beiden Geschlechtern durch eine Enzymhemmung die Kohlenwasserstoffexspiration in quantitativer Hinsicht unbeeinflußt bleibt, während die Malondialdehydbildung bei männlichen Versuchstieren signifikant ($p < 0,05$), bei weiblichen Versuchstieren jedoch nur geringgradig erniedrigt wird.

6.3.2 Testversuche in synthetischer Luft mit verschiedenem Sauerstoffgehalt

Die Ergebnisse der Testversuche, bei denen der Einfluß des Sauerstoffgehaltes in der Inspirationsluft auf die Kohlenwasserstoffexspiration und die Malondialdehydbildung in der Leber nach Methoxyfluranbelastung männlicher Versuchstiere (Dosierschema wie bei den Testversuchen in synthetischer Luft) untersucht worden ist, sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt.

Tab. 13: Wirkungsflächen der Äthan- und Äthenakkumulation (nmol mg/kg^2. t) sowie der Malondialdehydbildung (nmol mg/g kg.t) bei männlichen Versuchstieren nach Methoxyfluranbelastung; verschiedener Sauerstoffgehalt der Inspirationsluft, t = 180 min, n =

Sauerstoffgehalt (Vol%)		Parameter		
		Äthan	Äthen	MDA
17,5	$\bar{x}$	5935	3389	2561
	R	4783 - 8209	2738 - 4493	-5838 - 8385
22,5	$\bar{x}$	4875	2820	-5496
	R	3824 - 5878	1423 - 3728	-6190 - -4318
25,0	$\bar{x}$	3794	2801	3446
	R	3237 - 4713	2074 - 3785	83 - 5754
99,9	$\bar{x}$	3762	3420	218
	R	3025 - 5086	2885 - 4405	-3912 - 7008

R: Spannweite; Bedeutung der übrigen Symbole wie bei Tabelle 5

Aus Tabelle 13 läßt sich entnehmen, daß die Äthanexspiration mit steigendem Sauerstoffgehalt der Inspirationsluft abnimmt. Die Unterschiede zwischen den Wirkungsflächen sind jedoch bei der gewählten Irrtumswahrscheinlichkeit ($p < 0,05$) statistisch nicht differenzierbar.

IV DISKUSSION

1 Untersuchungsmethode

Der Nachweis einer Exspiration flüchtiger Kohlenwasserstoffe ist eine weit verbreitete Methode, um eine radikalbedingte oxidative Zersetzung mehrfach ungesättigter Fettsäuren i n v i v o nachzuweisen. Dabei wird in Kauf genommen, daß nicht gesagt werden kann, aus welchem Gewebe des Organismus' bzw. aus welcher Zellorganelle diese Kohlenwasserstoffe jeweils anfallen (Recknagel et al., 1982; Riely et al., 1974; Dillard et al., 1977).

Welcher Kohlenwasserstoff bei einer Lipidperoxidation bevorzugt entsteht, ist nach Auffassung von Dumelin und Tappel (1977), Cohen (1979) sowie Gee und Tappel (1981) eher von der geschädigten Fettsäure als von der schädigenden Noxe abhängig. Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, daß verschiedene Radikalbildner - hier: Schwermetalle - bei vergleichbaren Tierkollektiven (gleiches Fettsäuremuster) die Kohlenwasserstoffbildung in vivo sehr spezifisch beeinflussen können (Schmid et al., 1982).

Der Nachweis von Äthen ist in diesem Zusammenhang jedoch mit Vorbehalten zu bewerten, da in vitro gezeigt wurde, daß sich dieser Kohlenwasserstoff auch bei radikalischer Zersetzung von Methionin bzw. Methional bildet (Beauchamp und Fridovich, 1970), eine Möglichkeit, die in vivo nicht ausgeschlossen werden kann. Unabhängig von seiner Entstehung scheint die Exspiration von Athen jedoch die Anwesenheit von freien Radikalen in vivo anzuzeigen.

Malondialdehyd stellt einen zuverlässigen Indikator für eine stattgehabte Lipidperoxidation dar (Recknagel et al., 1982), ist jedoch erst p o s t m o r t e m bestimmbar. Dabei konnte in vitro gezeigt werden, daß das durch Pigmentbildung mit Thiobarbitursäure (TBA) erfaßbare sogenannte TBA-reaktive Material tatsächlich Malondialdehyd ist (Recknagel et al., 1982). Für die Beurteilung der Empfindlich-

keit des Malondialdehydnachweises ist von Bedeutung, daß die molare Ausbeute des Aldehyds nur ca. 12 % der peroxidierten Polyenfettsäuren äquivalent ist und daß Malondialdehyd im tierischen Organismus schnell metabolisiert wird (Recknagel et al., 1982).

2 Ergebnisse

Im Blindversuch ist zunächst gezeigt worden, daß die gesuchten Kohlenwasserstoffe durch Zersetzung von Methoxyfluran in vitro nicht entstehen (Abb. 5).

Die Ergebnisse der Kontrollversuche (Tab. 5) zeigen, daß bei nicht vorbehandelten Versuchstieren offensichtlich eine Spontanbildung der drei gewählten Untersuchungsparameter stattfindet. Diese Befunde können als Bestätigung dafür gewertet werden, daß in vivo eine gewissermaßen "physiologische" Lipidperoxidation erfolgt. Sie scheint von der Aktivität der mischfunktionellen Oxygenasen abzuhängen (Schmid, 1982 a und b; Schmid und Christoph, 1980; Frank et al., 1980), was auch durch ihre offenbare Beeinflußbarkeit mit Enzyminduktoren bzw. -hemmstoffen nahegelegt wird (Tab. 5).

Äthanbildung. Werden die Versuchstiere mit Methoxyfluran belastet, so kann eine signifikante Steigerung der spontanen Äthan- und Äthenexspiration beobachtet werden (Tab. 7 und 8). Dabei weisen die Dosis-Wirkungskurven, insbesondere für die Äthananreicherung in der Exspirationsluft, eine mehr (männliche Versuchstiere) oder weniger (weibliche Tiere) deutliche zweigipfelige Verlaufscharakteristik auf, die in den Abbildungen 6 und 7 graphisch veranschaulicht ist. Eine solche, für Methoxyfluran bisher noch nicht beschriebene "wellenförmige" Abhängigkeit der Äthanexspiration von der Dosis des Inhalationsanästhetikums ist bei Halothan und Enfluran bereits bekannt (Beuter und Schmid, 1982). Sie läßt sich mit einer Schädigung der mischfunktionellen Oxygenasen durch radikalische Fremdstoffmetaboliten in m e h r e r e n Verteilungsräumen des Organismus' erklären (Schmid, 1982 b).

Im vorliegenden Fall ist z. B. naheliegend, daß Methoxyfluran nach intraperitonealer Applikation zunächst in der Leber zu reaktionsfähigen Metaboliten umgesetzt wird, welche bei ihrer Entstehung die Oxygenasen dieses Organs dosisabhängig schädigen, so daß die Kohlenwasserstoffbildung bzw. -exspiration zunächst ansteigt und dann wieder abfällt. Dieser Vorgang wird sich bei weiterer Erhöhung der Methoxyflurandosis im nächsterreichbaren Verteilungsraum wiederholen.

Durch Enzyminduktion mit Phenobarbital, also bei höherer Metabolisierungsrate von Methoxyfluran (Van Dyke, 1966; Fiserova-Bergerova, 1973), wird die Steigerung der Äthanexspiration gegenüber den entsprechenden Kontrollwerten im u n t e r e n Dosierungsbereich von Methoxyfluran erhöht (Tab. 9 sowie Abb. 6 und 7). Die im o b e r e n Dosierungsbereich zu beobachtende Abnahme der Äthanexspiration bzw. -akkumulation im Vergleich zu unvorbehandelten Versuchstieren (Abb. 6 und 7) spricht für eine relativ stärkere Schädigung der induzierten (aktiveren) Oxygenasen durch die vermehrt entstehenden Metaboliten.

Im Gegensatz zu dieser "Depression" der Äthanexspiration bzw. -akkumulation durch eine Enzyminduktion verursacht eine Enzymhemmung mit Piperonylbutoxid eine Zunahme der Äthanbildung (Abb. 6 und 7), die sich bei den männlichen Versuchstieren (Abb. 6) auch als Linksverschiebung der Dosis-Wirkungskurve (stärkere Äthanproduktion durch niedrige Dosen) darstellt. Man kann diesen Effekt als verzögerte Enzyminaktivierung durch Methoxyfluranmetaboliten in Verbindung mit einem anhaltend höheren Methoxyfluranangebot (infolge verlangsamter Metabolisierung) in den Verteilungsräumen des Organismus' verstehen.

Äthenbildung. Die Äthenexspiration bzw. -akkumulation wird durch eine Methoxyfluranbelastung der Versuchstiere weniger stark stimuliert als die Äthanbildung (s. Tab. 7 und 8). Dies mag mit einer unterschiedlichen Biosynthese der beiden Kohlenwasserstoffe zusammenhängen (s. o.).

Im Gegensatz dazu wird die Äthenbildung durch eine vorhergehende Enzyminduktion (s. Tab. 9 und 10) bzw. eine Enzymhemmung (s. Tab. 11 und 12) qualitativ gleich beeinflußt wie die Äthanbildung (vgl. Abb. 6 und 8 bzw. 7 und 9). Man kann deshalb auf die gleiche Ursache, d. h. eine Abhängigkeit der Äthan- und Äthenbildung vom Umfang der Methoxyfluranmetabolisierung, schließen.

Malondialdehydbildung. Durch die Bestimmung des in der L e b e r gebildeten Malondialdehyds wird die Lipidperoxidation in e i n e m begrenzten Verteilungsraum(teil) von Methoxyfluran erfaßt. Die Ergebnisse zeigen, daß zumindest bei männlichen Versuchstieren eine Biotransformation von Methoxyfluran zu Radikalen anzunehmen ist (signifikante Steigerung der Malondialdehydbildung, s. Tab. 8). Dies kann aber auch bei weiblichen Tieren nicht ausgeschlossen werden, da angesichts der raschen Metabolisierung von Malondialdehyd (s. o.) nur einem positiven Nachweis Aussagekraft beigemessen werden sollte.

Die Befunde, daß Malondialdehyd in der Leber durch Beeinflussung der Enzymaktivität (Stimulation bzw. Hemmung) im Gegensatz zu den Kohlenwasserstoffen nur vermindert wird (Tab. 10 bzw. 12 verglichen mit Tab. 8), legen nahe, daß dieses Organ allein n i c h t mit einem der Verteilungsräume von Methoxyfluran identisch zu sein scheint. Eine extrahepatische Biotransformation von Methoxyfluran ist durch In Vitro-Untersuchungen bekannt (Niere und Thymus - Van Dyke und Chenoweth, 1965; Lunge - Blitt et al., 1979), eine extrahepatische Umsetzung zu Radikalen in vivo prinzipiell möglich.

Sauerstoffpartialdruck. Schließlich wurde bei männlichen Versuchstieren die experimentelle Klärung der Frage versucht, ob ein unterschiedlicher Sauerstoffgehalt der Inspirationsluft die Radikalbildung aus Methoxyfluran beeinflußt.

Diese Frage stellt sich deshalb, weil ein niedriger Sauerstoffpartialdruck die reduktive Metabolisierung bzw. Radikalbildung eines Xenobioticums begünstigt (Schmid, 1982 a und b) und hypoxämische Zustände bei Allgemeinnarkosen

eintreten können.

Wie aus Tabelle 13 hervorgeht, besteht zwar eine negative Korrelation zwischen der Äthanakkumulation nach Methoxyfluranbelastung und dem Sauerstoffgehalt der Inspirationsluft. Da die Unterschiede zwischen den Wirkungsflächen bei der gewählten Irrtumswahrscheinlichkeit jedoch statistisch nicht differenziert werden konnten, ist dieses Ergebnis, das auf eine gesteigerte Radikalbildung aus Methoxyfluran bei Sauerstoffmangel schließen läßt, nur mit Vorbehalt verwertbar.

3 Schlußfolgerungen

Insgesamt läßt sich aus den diskutierten Befunden der Schluß ziehen, daß Methoxyfluran bei der Maus in vivo zu Metaboliten mit Radikaleigenschaften biotransformiert wird.

Angesichts der möglichen Schädigungen, die eine Radikalbildung nach sich ziehen kann (s. Abschnitt 1 der Literaturübersicht), ist diese Art der Verstoffwechslung als eine "Giftung" von Methoxyfluran anzusehen.

Insofern muß auch eine Mitbeteiligung intermediär gebildeter Methoxyfluranradikale bei der Pathogenese verschiedener Nebenwirkungen des Inhalationsanästhetikums, besonders seiner Nephro- und Hepatotoxizität, in Betracht gezogen werden.

Dabei sollte aber bedacht werden, daß die Ergebnisse bei der Maus gewonnen wurden und einer experimentellen Bestätigung bei anderen Tierarten und dem Menschen bedürfen.

V ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wird über die experimentelle Untersuchung des Inhalationsanästhetikums Methoxyfluran auf radikalbildende Eigenschaften in vivo berichtet.

Die Untersuchungen sind mit erwachsenen, konventionell gehaltenen und ernährten Mäusen beiderlei Geschlechts durchgeführt worden, denen Methoxyfluran intraperitoneal verabreicht wurde.

Als Untersuchungsparameter wurden Äthan und Äthen in der Exspirationsluft sowie Malondialdehyd in der Leber der Versuchstiere gaschromatographisch bzw. kolorimetrisch erfaßt. Dabei handelt es sich um typische Folgeprodukte einer radikalinduzierten Schädigung von zellulären und/oder subzellulären Membranlipiden.

Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

a) Methoxyfluran verursacht bei beiden Geschlechtern eine signifikante Steigerung der Äthan- und der Äthenexspiration; die Malondialdehydbildung wird nur bei männlichen Versuchstieren signifikant erhöht.

b) Die Kohlenwasserstoffexspiration weist einen zweigipfeligen Dosis-Wirkungsverlauf auf.

c) Durch Enzyminduktion mit Phenobarbital wird die Äthanexspiration bei niedrigen Methoxyflurandosen stärker erhöht, bei höheren Dosen jedoch verringert; Enzymhemmung mit Piperonylbutoxid hat bei männlichen Versuchstieren eine Linksverschiebung bei gleichzeitiger Erhöhung der Gipfel des Dosis-Wirkungsverlaufes der Äthanexspiration zur Folge. Die Malondialdehydbildung wird sowohl durch Enyzminduktion als auch -hemmung vermindert.

d) Bei männlichen Versuchstieren besteht eine negative Korrelation zwischen dem Sauerstoffgehalt der Inspirationsluft und der Äthanexspiration; dieses Ergebnis ist jedoch nur mit Vorbehalt auswertbar.

Die Einzelbefunde werden interpretiert und diskutiert.

Aus den Ergebnissen wird der Schluß gezogen, daß Methoxyfluran bei der Maus zu radikalischen Metaboliten umgesetzt wird.

Die Bedeutung dieses Befundes und seine Übertragbarkeit auf andere Tierarten sind in der Diskussion erörtert.

VI SUMMARY

The present study reports on the experimental testing of the inhalation anaesthetic methoxyflurane on radical inducing properties in vivo.

The tests were carried out with adult, conventionally kept and fed mice of both sexes, to which methoxyflurane had been administered intraperitoneally.

As test parameters, ethane and ethylene in the exhaled air and malonaldehyde in the liver of the experimental animals were examined gaschromatographically respectively colorimetrically. These are typical products originating from radical-induced damage to cellular and/or subcellular membrane lipids.

The results can be summarized as follows:

a) Methoxyflurane causes a significant rise in the expiration of ethane and ethylene in both sexes, while the formation of malonaldehyde is increased with male experimental animals only.

b) The expiration of hydrocarbons shows a bi-peaked dose-effect curve.

c) Through enzymic induction with phenobarbital the expiration of ethane is more increased with low doses of methoxyflurane but decreased with higher doses; in male experimental animals, enzymic inhibition with piperonyl-butoxide causes a peak shifting to the left and a simultaneous increase in peak height in the dose-effect curve of ethane expiration. Malonaldehyde formation is decreased both with enzymic induction and enzymic inhibition.

d) A negative correlation between the oxygen contents of inspired air and the expiration of ethane was found in male experimental animals, this result being rated but with reservation.

Each of the findings is interpreted and discussed.

From the results the conclusion is drawn that methoxyflurane is transformed to radical metabolites in the mouse.

The significance of this finding and its transferability to other animal species is discussed.

VII LITERATURVERZEICHNIS

Artusio J F Jr, Van Poznak A, Hunt R E, Tiers F M, Alexander M
A clinical evaluation of methoxyflurane in man
Anesthesiology 21, 512 - 517, 1960

Asakawa T, Matsushita S
A colorimetric microdetermination of peroxide values utilizing aluminium chloride as the catalyst
Lipids 15, 965 - 967, 1980

Baden J M, Kelley M, Wharton R S, Hitt B A, Simmon V F, Mazze R I
Mutagenicity of halogenated ether anesthetics
Anesthesiology 46, 346 - 350, 1977

Baden J M, Rice Susan A, Denson D D, Mazze R I
Deuterated methoxyflurane (d_4-methoxyflurane) anesthesia
Anesthesiology 51, Suppl S 263, 1979

Baden J M, Rice Susan A, Mazze R I
Deuterated methoxyflurane anesthesia and renal function in Fischer 344 rats
Anesthesiology 56, 2 3 - 206, 1982

Barber A A, Bernheim F
Lipid peroxidation: its measurement, occurence and significance in animal tissues
Adv Gerontol Res 2, 355 - 403, 1967

Barr G A, Cousins M J, Mazze R I, Hitt B A, Kosek J C
A comparison of the renal effects and metabolism of enflurane and methoxyflurane in Fischer 344 rats
J Pharmacol Exp Ther 188, 257 - 264, 1974

Bartoli G M, Sies H
Reduced and oxidized glutathione efflux from liver
FEBS Letters 86, 89 - 91, 1978

Beauchamp Ch, Fridovich I
A mechanism for the production of ethylene from methional
J Biol Chem 24, 4641 - 4646, 1970

Becker F B
Fatal massive liver necrosis after repeated methoxyflurane anesthesia
Lancet 2, 719 - 72 , 1970

Benedetto Chiara, Dianzani M U, Ahmed M, Cheeseman K, Connelly Carol, Slater T F
Activation of carbon tetrachloride, and distribution of NADPH-cytochrome c reductase, cytochrome P-450, and other microsomal enzyme activities in rat tissues
Biochim Biophys Acta 677, 363 - 372, 1981

Berman M L, Bochantin J F
Nonspecific stimulation of drug metabolism in rats by methoxyflurane
Anesthesiology 32, 500 -506 , 1970

Bernheim F, Bernheim M L C, Wilbur K M
The reaction between thiobarbituric acid and the oxidation products of certain lipids
J Biol Chem 174, 257 - 264, 1948

Beuter W
Radikalbildung durch Schwermetalle
Der Praktische Tierarzt 9, 792 - 800, 1982 a

Beuter W
Persönliche Mitteilung
1982 b

Beuter W, Schmid A
Metabolische Radikalbildung aus Halothan und Enfluran und ihre Beeinflussung durch Enzyminduktion und -hemmung
2ter Kongreß der EAVPT vom 13. bis 17.9.1982 in Toulouse

Black G W
Cardiovascular, respiratory and hepatic effects of inhalational anaesthetics
In: Gray T C, Nunn J F, Utting J E (eds)
General Anesthesia, pp 159 - 187
Fourth Edition, Vol. 1
London, Boston: Butterworth's, 1980

Blettery B, Foissac-Durand J, Michiels R, Just-Rabot E, Franc B, Caillard B
Nécrose tubulaire rénale et hépatite cytolytique après inhalation anesthésique itérative de méthoxyflurane
J Europ de Toxicol 4, 257 - 260, 1972

Blitt C D, Brown B R Jr, Wright Barbara J, Gandolfi A J, Sipes I G
Pulmonary biotransformation of methoxyflurane: an in vitro study in the rabbit
Anesthesiology 51, 528 - 531, 1979

Bohn F K
Klinische Erfahrungen bei der Anästhesie von Hunden und Katzen
Der Praktische Tierarzt 7, 403 - 408, 1975

Bonse G, Metzler M
Biotransformationen organischer Fremdsubstanzen
Stuttgart: Thieme, 1978

Borg D C
Electron spin resonance applied to free radicals of physiological, pharmacological or biochemical interest
In: Swartz H M, Bolton J F, Borg D C (eds)
Biological Applications of Electron Spin Resonance
New York, London, Sydney, Toronto: Wiley-Interscience, 1972

Borona M, Novello F, Bonetti E, Cetrullo C
RNA-synthesis in rat kidneys after fluorinated anesthetics or inorganic fluoride administration
Experientia 35, 71 - 72, 1979

Boveris A, Cadenas E, Chance B
Ultraweak chemiluminescence: a sensitive assay for oxidative radical reactions
Fed Proc 40, 195 - 198, 1981

Brodeur J, Paquin P, Authier L, Geadah D, Yamauchi M, Côté M
Influence of phenobarbital pretreatment on methoxyflurane and sodium fluoride nephropathy in Fischer 344 rats
Tox Appl Pharmacol 37, 349 - 361, 1976

Brunson D B, Stowe C M, McGrath C J
Serum and urine organic fluoride concentrations and urine oxalate concentrations following methoxyflurane anesthesia in the dog
Am J Vet Res 40, 197 - 203, 1979

Büch H P, Büch Uta
Narkotika / Narkose
In: Forth W, Henschler D, Rummel W (Hrsg)
Pharmakologie und Toxikologie, 3. Aufl., S. 374 - 394
Mannheim, Wien, Zürich: BI-Wissenschaftsverlag, 1980

Buntenkötter S
Anästhesiologische Untersuchungen an Jungschweinen
Deutsche Tierärztliche Wochenschrift 86, 377 - 420, 1979

Bunyan J, Murrell Elspeth A, Green J, Diplock A T
On the existence and significance of lipid peroxides in vitamin-E-deficient animals
Br J Nutr 21, 475 - 495, 1967

Burke M D, Orrenius S
Isolation and comparison of endoplasmic reticulum membranes and their mixed function oxidase activities from mammalian extrahepatic tissues
Pharmac Ther 7, 549 - 599, 1979

Cale J O, Packs C R, Jenkins M T
Hepatic and renal effects of methoxyflurane in dogs
Anesthesiology 23, 248 - 250, 1962

Carpenter Mary P
Antioxidant effects on the prostaglandin endoperoxide synthetase product profile
Fed Proc 40, 189 - 194, 1981

Churchill D, Knaack J, Chirito F, Barré P, Cole C, Muehrcke R, Gault M H
Persisting renal insufficiency after methoxyflurane anesthesia: report of two cases and review of literature
Am J Med 56, 575 - 582, 1974

Cohen E N
Toxicity of inhalation anaesthetic agents
Br J Anaesth 50, 665 - 675, 1978

Cohen G, Riely Caroline A, Lieberman M
Ethane formation from lipid peroxides in mammalian cells
Fed Proc 27, 648 (abstr 2436), 1968

Cohen G
Lipid peroxidation: detection in vivo and in vitro through the formation of saturated hydrocarbon gases
In: Ciba Foundation Symposium 65 (new series)
Oxygen Free Radicals and Tissue Damage, pp 177 - 182
Amsterdam, New York: Excerpta Medica, 1979

Corbett T H, Ball Gwendolyn L
Chronic exposure to methoxyflurane: a possible occupational hazard to anesthesiologists
Anesthesiology 34, 532 - 537, 1974

Coultas R J, Strumin L, Walker W D, Strumin J M, Reynard A, Simpson B R
A comparison of the effects of halothane and methoxyflurane on the isolated perfused canine liver
Br J Anaesth 41, 790 - 791, 1969

Cousins M J, Nishimura T G, Mazze R I
Renal effects of low-dose methoxyflurane with cardiopulmonary bypass
Anesthesiology 36, 286 - 292, 1972

Cousins M J, Mazze R I, Kosek J C, Hitt B A, Love F V
The etiology of methoxyflurane nephrotoxicity
J Pharmacol Exp Ther 190, 530 - 541, 1974

Crandell W P, Pappas S G, MacDonald A
Nephrotoxicity associated with methoxyflurane anesthesia
Anesthesiology 27, 591 - 607, 1966

Dahle L K, Hill E G, Holman R T
The thiobarbituric acid reaction and the autoxidations of polyunsaturated fatty acid methyl esters
Arch Biochem Biophys 98, 253 - 261, 1962

Dahlgren B E, Goodrich B H
Changes in kidney and liver function after methoxyflurane (Penthrane (R)) anaesthesia
Br J Anaesth 48, 145 - 149, 1976

Dailey B P
Halogen bond character in the alkyl halides
J Chem Phys 33, 1641 - 1643, 1960

De Matteis F
Loss of liver cytochrome P-450 caused by chemicals
In: De Matteis F, Aldridge W N (eds)
Heme and hemoproteins, pp 110 - 115
Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Vol. 44
(Heffter-Heubner, new series)
Berlin, New York: Springer, 1978

Demopoulos H B
The basis of free radical pathology
Fed Proc 32, 1859 - 1861, 1973 a

Demopoulos H B
Control of free radicals in biologic systems
Fed Proc 32, 1903 - 1908, 1973 b

Dianzani M U
Biochemical aspects of fatty liver
In: Slater T F (ed)
Biochemical mechanisms of liver injury, pp 45 - 95
New York: Academic Press, 1978

Dianzani M U, Ugazio G
Lipid peroxidation
In: Slater T F (ed)
Biochemical mechanisms of liver injury, pp 669 - 707
New York: Academic Press, 1978

Diezi J
Toxicité rénale des médicaments
Rev Med Suisse Romande 100, 959 - 963, 1980

Dillard Cora J, Tappel A L
Fluorescent products from reaction of peroxidizing
polyunsaturated fatty acids with phosphatidyl
ethanolamine and phenylalanine
Lipids 8, 183 - 189, 1973

Dillard Cora J, Dumelin E E, Tappel A L
Effect of dietary vitamin E on expiration of pentane
and ethane by the rat
Lipids 12, 109 - 114, 1977

Dillard Cora J, Tappel A L
Volatile hydrocarbon and carbonyl products of lipid
peroxidation: a comparison of pentane, ethane, hexanal,
and acetone as in vivo indices
Lipids 14, 989 - 995, 1979

Dobkin A B, Fedoruk Sylvia
Comparison of the cardiovascular, respiratory and meta-
bolic effects of methoxyflurane and halothane in dogs
Anesthesiology 22, 355 - 362, 1961

Dreyer C, Bischoff D, Göthert M
Effects of methoxyflurane anesthesia on adrenal medullary catecholamine secretion: inhibition of spontaneous secretion and secretion evoked by splanchnic-nerve stimulation
Anesthesiology 41, 18 - 26, 1974

Dumelin E E, Tappel A L
Hydrocarbon gases produced during in vitro peroxidation of polyunsaturated fatty acids and decomposition of preformed hydroperoxides
Lipids 12, 894 - 899, 1977

Durkin M G, Brick I B, Schreiner G E
Fatal hepatic necrosis following Penthrane(R) anesthesia
Gastroenterology 5o, 420 (abstr), 1966

Eger E I II, White Anne E, Brown C L, Biava C G, Corbett T H, Stevens W C
A test of the carcinogenicity of enflurane, isoflurane, halothane, methoxyflurane and nitrous oxide in mice
Anesth Analg (Cleve) 57, 678 - 694, 1978

Eger E I II
Inhalational anaesthesia: pharmacokinetics
In: Gray T C, Nunn J F, Utting J E (eds)
General Anesthesia, pp 67 - 97
Fourth Edition, Vol. 1
London, Boston: Butterworth's, 1980

Elkington S G, Goffinet J A, Conn H O
Renal and hepatic injury associated with methoxyflurane anesthesia
Ann Intern Med 69, 1229 - 1236, 1968

Epstein J, Gershon D
Studies on ageing in nematodes. IV. The effect of antioxidants on cellular damage and life span
Mech Age Dev 1, 257 - 264, 1972

Fink R B, Kenny G E
Metabolic effects of volatile anesthetics in cell culture
Anesthesiology 29, 505 - 516, 1968

Fiserova-Bergerova Vera
Changes of fluoride content in bone: an index of drug defluorination in vivo
Anesthesiology 38, 345 - 351, 1973

Fiserova-Bergerova Vera, Holaday D C
Uptake and clearance of inhalation anesthetics in man
Drug Metab Rev 9, 43 - 60, 1979

Fleming J T, Pedersoli W M
Serum inorganic fluoride and renal function in dogs after methoxyflurane anesthesia, tetracycline treatment, and surgical manipulation
Am J Vet Res 41, 2025 - 2029, 1980

Fong K, McCay P B, Poyer J L
Evidence that peroxidation of lysosomal membranes is initiated by hydroxyl free radicals produced during flavin enzyme activity
J Biol Chem 248, 7792 - 7797, 1973

Frank H, Hintze T, Remmer H
Volatile hydrocarbons in breath as an indicator for peroxidative degradation of lipids
Überlingen: 2nd International Symposium on Headspace Analysis im Oktober 1978

Frank H, Hintze T, Bimboes D, Remmer H
Monitoring lipid peroxidation by breath analysis: endogenous hydrocarbons and their metabolic elimination
Tox Appl Pharmacol 56, 337 - 344, 1980

Frascino J A, Vanamee P, Rosen P P
Renal oxalosis and azotemia following methoxyflurane anesthesia
N Engl J Med 283, 676 - 679, 1970

Fry B W, Taves D R, Merin R G
Fluorometabolites of methoxyflurane
Anesthesiology 38, 38 - 44, 1973

Gaudette L E, Brodie B B
Relationship between the lipid solubility of drugs and their oxidation by liver microsomes
Biochem Pharmacol 2, 89 - 96, 1959

Gee D L, Tappel A L
Production of volatile hydrocarbons by isolated hepatocytes: an in vitro model for lipid peroxidation studies
Tox Appl Pharmacol 60, 112 - 120, 1981

Giesecke A H, Beck G P, Jenkins M T, Kallus F T, Stembridge V A
Hepatic effects of methoxyflurane in nutritionally deprived dogs
Anesth Analg 45, 829 - 834, 1966

Gilette J R
Biochemistry of drug oxidation and reduction by enzymes in hepatic endoplasmatic reticulum
Adv Pharmacol 4, 219 - 261, 1966

Goto Y, Dujovne C A, Shoeman D W, Arakawa K
Liver cell culture toxicity of general anesthetics
Tox Appl Pharmacol 36, 121 - 130, 1976

Gottlieb L S, Trey G
The effects of fluorinated anesthetics on the liver and the kidneys
Ann Rev Med 25, 411 - 429, 1974

Greim H
Adaptation der Biotransformation
(Biochemie der Induktion)
In: Gerok W, Sickinger U (Hrsg)
Arzneimittel und Leber
Stuttgart: Schattauer Verlag, 1975

Hack G, Karzel K, Panthong A, Stein P
In Vitro-Untersuchungen zum Einfluß von volatilen Anaesthetika auf Zellvermehrung, Zellvolumen sowie zellulären Protein- und Nucleinsäurestoffwechsel
Anaesthesist 30, 134 - 143, 1981

Hafeman D G, Hoekstra W
Protection against carbontetrachloride induced lipid peroxidation in the rat by dietary vitamin E, selenium and methionine as measured by ethane evolution
J Nutr 107, 656 - 665, 1977

Halpren B A, Kempson R L, Coplon N S
Interstitial fibrosis and chronic renal failure following methoxyflurane anesthesia
JAMA 223, 1239 - 1242, 1973

Halsey M J, Sawyer D C, Eger E I II, Bahlman S H, Impelman Dianne M
Hepatic metabolism of halothane, methoxyflurane, cyclopropane, ethrane and forane in miniature swine
Anesthesiology 35, 43 - 47, 1971

Halsey M J
Physicochemical properties of inhalational anaesthetics
In: Gray T C, Nunn J F, Utting J E (eds)
General Anesthesia, pp 45 - 65
4th Edition, Vol. 1
London, Boston: Butterworth's, 1980

Herstellerangabe
Penthrane (R) - Methoxyfluran, Produktinformation
Wiesbaden: Deutsche Abbott, ohne Jahr

Hill H A O
The chemistry of dioxygen and its reduction products
In: Ciba Foundation Symposium 65 (new series)
Oxygen Free Radicals and Tissue Damage
Amsterdam: Excerpta Medica, 1979

Hilwig R W
General anesthesia with methoxyflurane given intravenously to the dog
Am J Vet Res 37, 257 - 262, 1976

Hintze T, Remmer H
Lipidperoxidation in vivo and in vitro due to $CBrCl_3$ or ethanol
Arch Pharmacol 307 (S), Nr. 80, 1979

Hitt B A, Mazze R I
Effect of enzyme induction on nephrotoxicity of halothane related compounds
Env Health Perspect 21, 179 - 183, 1977

Hitt B A, Mazze R I, Denson D D
Isotopic probe of the mechanism of methoxyflurane defluorination
Drug Metab Disp 7, 446 - 447, 1979

Hochstein P, Jain S K
Association of lipid peroxidation and polymerization of membrane proteins with erythrocyte ageing
Fed Proc 40, 183 - 188, 1981

Högberg J
Regulation and effects of lipid peroxidation in isolated hepatocytes
In: Jollow D J, Kocsis J J, Snyder R, Vainio H (eds)
Biological Reactive Intermediates: Formation, Toxicity and Inactivation, pp 401 - 414
New York, London: Plenum Press, 1977

Holaday D A, Rudofsky Susanna, Treuhaft P S
The metabolic degradation of methoxyflurane in man
Anesthesiology 33, 579 - 593, 1970

Holaday D C, Fiserova-Bergerova Vera
Fate of fluorinated metabolites of inhalation anesthetics in man
Drug Metab Rev 9, 61 - 78, 1979

Holden T E, Sherline D M
Hepatitis and hepatic failure in pregnancy
Obstet Gynecol 40, 586 - 593, 1972

Hunter F E Jr, Scott A, Hoffsten P E, Guerra F, Weinstein J, Schneider A, Schutz Beverly, Fink Joan, Ford Lillian, Smith Ellen
Studies on the mechanism of ascorbate-induced swelling and lysis of isolated liver mitochondria
J Biol Chem 239, 604 - 613, 1964

Ingelman-Sundberg M
Bioactivation or inactivation of toxic compounds?
Trends Pharmacol Sci 1, 176 - 179, 1980

Ivanetich Kathryn M, Lucas Sharon A, Marsh Julia A
Enflurane and methoxyflurane: their interaction with hepatic cytochrome P-450 in vitro
Biochem Pharmacol 28, 785 - 792, 1979

Ivanetich Kathryn M, Manca Veronica, Harrison Gaisford G, Berman Mervyn
Enflurane and methoxyflurane: their interaction with hepatic microsomal stearate desaturase
Biochem Pharmacol 29, 27 - 34, 1980

Jenner P, Testa B, Di Carlo F J
Xenobiotic and endobiotic metabolizing enzymes:
an overstretched discrimination ?
Trends Pharmacol Sci 2, 135 - 137, 1981

Joshi P H, Conn H O
The syndrome of methoxyflurane associated hepatitis
Ann Intern Med 80, 395 - 401, 1974

Judson J A, De Jongh H J, Walmsley J B W
Possible cross-sensitivity between halothane and
methoxyflurane: report of a case
Anesthesiology 35, 527 - 532, 1971

Kalkay N M
Polyuric renal failure and hepatitis
N Y State J Med 71, 2265 - 2269, 1977

Keeney M
Secondary degradation products
In: Schultz H W, Day E A, Sinnhuber
Lipids and their oxidation, pp 79 - 89
Westport Conn.: Avi. Pupl., 1962

Klein N C, Jeffries G H
Hepatotoxicity after methoxyflurane administration
JAMA 197, 1037 - 1039, 1966

Klemmer P J, Hadler N M
Subacute fluorosis - a consequence of abuse of an organo-
fluoride anesthetic
Ann Intern Med 89, 607 - 611, 1978

Klingenberg M
Pigments of rat liver microsomes
Arch Biochem Biophys 75, 376 - 386, 1958

Koester U, Albrecht D, Kappus D
Evidence for carbon tetrachloride- and ethanol-induced
lipid peroxidation in vivo demonstrated by ethane pro-
duction in mice and rats
Tox Appl Pharmacol 41, 639 - 648, 1977

Kosek J C, Mazze R I, Cousins M F
The morphology and pathogenesis of nephrotoxicity follo-
wing methoxyflurane (Penthrane (R)) anesthesia - an
experimental model in rats
Lab Investig 27, 575 - 580, 1972

Kusyk Christine, Hsu T C
Mitotic anomalies induced by three inhalation halogenated
anesthetics
Env Res 12, 366 - 370, 1976

Kuzucu E Y
Methoxyflurane, tetracycline and renal failure
JAMA 211, 1162 - 1164, 1970

Larsen E R
The chemistry of modern inhalation anesthetics
In: Chenoweth M B (ed)
Modern Inhalation Anesthetics, pp 4 - 32
Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Vol 30
(Heffter-Heubner, new series)
Berlin, New York: Springer, 1972

Lindenbaum J, Leifer E
Hepatic necrosis associated with halothane anesthesia
N Engl J Med 268, 525 - 530, 1963

Lischner M W, MacNabb G M, Galambos J T
Fatal hepatic necrosis following surgery: possible
relation to methoxyflurane anesthesia
Arch Intern Med 120, 725 - 728, 1967

Little D M, Wetstone H J
Anesthesia and liver
Anesthesiology 25, 815 - 853, 1964

Loew Gilda, Motulsky H, Trudell J, Cohen E, Hjelmeland L
Quantum chemical studies of the metabolism of the inhala-
tion anesthetics methoxyflurane, enflurane, and isoflurane
Molec Pharmacol 10, 406 - 418, 1974

Lu A Y H, West Susan B
Multiplicity of mammalian microsomal cytochromes P-450
Pharmacol Rev 31, 277 - 295, 1980

Marshall B E, Wollman H
General anesthetics
In: Goodman G A, Goodman L S, Gilman A (eds)
The Pharmacological Basis of Therapeutics
6th Edition
New York: Macmillan Publ. Co., 1980

Mazze R I, Shue G L, Jackson S H
Renal dysfunction associated with methoxyflurane
anesthesia
JAMA 216, 278 - 288, 1971

Mazze R I, Cousins M J, Kosek J C
Dose-related methoxyflurane nephrotoxicity in rats: a
biochemical and pathologic correlation
Anesthesiology 36, 571 - 587, 1972

Mazze R I, Cousins M J
Renal toxicity of anesthetics with specific reference to
the nephrotoxicity of methoxyflurane
Can Anaest Soc J 20, 64 - 80, 1973

Mazze R I, Cousins M J, Kosek J C
Strain differences in metabolism and susceptility to the
nephrotoxic effects of methoxyflurane in rats
J Pharm Exp Ther 184, 481 - 488, 1973

Mazze R I, Hitt B A
Methoxyflurane metabolism
Anesthesiology 44, 369 - 371, 1976

McCay P B, Toshikazu N, Fong K-L, Lai E K, Poyer J L
Production of radicals from enzyme systems and the use of spin traps
In: Pryor W A (ed)
Free Radicals in biology, Vol. IV, pp 155 - 186
New York: Academic Press, 1980

McCormack K M, Cagen S Z, Rickert D E, Gibson J E, Dent J G
Stimulation of hepatic and renal mixed-function oxidase in developing rats by polybromated biphenyls
Drug Metab Disp 7, 252 - 259, 1979

McGrath C J, Rempel W E Jessen C R, Addis P B, Crimi A J
Malignant hyperthermia-triggering liability of selected inhalant anesthetics in swine
Am J Vet Res 42, 604 - 607, 1981

McIntyre J W R, Russell J C, Chambers M
Oxalemia following methoxyflurane anesthesia in man
Anesth Analg (Cleve) 52, 946 - 950, 1973

Mead J F
Free radical mechanisms of lipid damage and consequences for cellular membranes
In: Pryor W A (ed)
Free Radicals in Biology, Vol. I, pp 51 - 68
New York: Academic Press, 1976

Messick V M, Willson D M, Theye R A
Canine renal function and VO_2 during methoxyflurane anesthesia
Anesth Analg (Cleve) 51, 933 - 941, 1972

Min K-W, Cain G D, Sabel J S
Methoxyflurane hepatitis
South Med J 70, 1363 - 1364, 1977

Murray W J, Fleming P J
Defluorination of methoxyflurane during anesthesia: comparison of man with other species
Anesthesiology 37, 620 - 625, 1972

Ndiritu C G, Weigel J
Hepatorenal injury in a dog associated with methoxyflurane
Vet Med, Small Animal Clinican 72, 545 - 550, 1977

Nebert D W, Eisen H J, Negishi M, Lang M A, Hjelmeland L M, Okey A B
Genetic mechanisms controlling the induction of polysubstrate monooxygenase (P-450) activities
Ann Rev Pharm Tox 21, 431 - 462, 1981

Netter K J
Inhibition of oxidative drug metabolism in microsomes
Pharmacol Ther 1 , 515 - 535, 1980

Omura T, Sato R
The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes
I. Evidence for its hemoprotein nature
J Biol Chem 239, 2370 - 2378, 1964 a

Omura T, Sato R
The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes
II. Solubilization, purification and properties
J Biol Chem 239, 2379 - 2385, 1964 b

Paddock R B, Parker J W, Guadagni N P
The effects of methoxyflurane on renal function
Anesthesiology 25, 707 - 708, 1964

Panner B J, Freeman R B, Roth-Moyo L A, Markowitch W Jr
Toxicity following methoxyflurane anesthesia
I. Clinical and pathological observations in two fatal cases
JAMA 214, 86 - 90, 1970

Pasquali-Ronchetti Ivonne, Bini Anna, Botti Barbara,
De Aloisio Graziella, Fornieri C, Vannini V
Ultrastructural and biochemical changes induced by progressive lipidperoxidation on isolated microsomes and rat liver endoplasmatic reticulum
Lab Investig 42, 457 - 468, 1980

Pedersoli W M
Serum fluoride concentration, renal, and hepatic function test - results in dogs with methoxyflurane anesthesia
Am J Vet Res 38, 949 - 953, 1977

Pryor W A (ed)
Free radicals
New York, Toronto, London: McGraw-Hill Book Co., 1966

Pryor W A
Free radical reactions and their importance in biochemical systems
Fed Proc 32, 1862 - 1869, 1973

Pryor W A
The role of free radical reactions in biological systems
In: Pryor W A (ed)
Free Radicals in Biology, Vol. I, pp 1 - 49
New York: Academic Press, 1976

Purdy R E, Tappel A L
Permeation chromatography of fluorescent products from tissues and peroxidized lipids
J Chromatogr 170, 217 - 220, 1979

Recknagel R O, Glende E A Jr, Hruszkewycz A M
Chemical mechanisms in carbon tetrachloride toxicity
In: Pryor W A (ed)
Free Radiclas in Biology, Vol. III, pp 97 - 134
New York: Academic Press, 1977 a

Recknagel R O, Glende E A Jr, Hruszkewycz A M
New data supporting an obligatory role for lipid peroxidation in carbon tetrachloride-induced loss of aminopyrine demethylase, cytochrome P-450 and glucose-6-phosphatase
In: Jollow D J, Kocsis J J, Snyder R, Vainio H (eds)
Biological Reactive Intermediates: Formation, Toxicity and Inactivation, pp 417 - 428
New York, London: Plenum Press, 1977 b

Recknagel R O, Glende E A Jr, Waller R L, Lowrey K
Lipid peroxidation: biochemistry, measurement and significance in liver cell injury
In: Plaa G, Hewitt W R (eds)
Toxicology of the Liver, pp 213 - 241
New York: Raven Press, 1982

Reynolds E S, Moslen Mary T
Free radical damage in liver
In: Pryor W A (ed)
Free Radicals in Biology, Vol. IV, pp 49 - 94
New York: Academic Press, 1980

Riely Caroline A, Cohen G, Lieberman M
Ethane evolution: a new index of lipid peroxidation
Science 183, 208 - 210, 1974

Robertson G S, Hamilton W F D
Changes in kidney and liver function after methoxyflurane anesthesia (Correspondence)
Br J Anaesth 48, 711, 1976

Robinson J D
Structural changes in microsomal suspensions
III. Formation of lipid peroxides
Arch Biochem Biophys 112, 170 - 179, 1965

Roubal W T, Tappel A L
Damage to proteins, enzymes, and amino acids by peroxidizing lipids
Arch Biochem Biophys 113, 5 - 8, 1966

Roubal W T, Tappel A L
Damage to ATP by peroxidizing lipids
Biochim Biophys Acta 136, 402 - 403, 1967

Rouser G, Nelson G J, Fleisher S, Simon G
Lipid composition of animal cell membranes, organelles and organs
In: Chapman D (ed)
Biological Membranes, pp 5 - 70
New York: Academic Press, 1968

Rubin E
Iatrogenic hepatic injury
Hum Pathol 11, 312 - 331, 1980

Rubinger Devorah, Davidson J T, Melmed R N
Hepatitis following the use of methoxyflurane in obstetric analgesia
Anesthesiology 43, 593 - 595, 1975

Sachs L
Angewandte Statistik
5. Aufl.
Berlin, Heidelberg, New York: Springer, 1978

Salhab A S, Nooh N G, Dujovne C A
Hepatocyte responses to volatile anesthetics: changes in surface scanning and enzyme leakage
Anesth Analg 57, 605 - 609, 1978

Saprin A N, Piette L H
Spin trapping and its application in the study of lipid peroxidation and free radical production with liver microsomes
Arch Biochem Biophys 180, 480 - 492, 1977

Schenkman J B, Gibson G G
Status of the cytochrome P-450-cycle
Trends Pharmacol Sci 2, 150 - 152, 1981

Schmid A
Causes of drug related iron-intoxication. Ethane expiration of mice following intraperitoneal Fe^{2+}-administration
Arch Pharmacol 307 (S), Nr. 86, 1979

Schmid A, Christoph M
Untersuchungen zur Genese der parenteralen Eisenvergiftung
Der Praktische Tierarzt 7, 589 - 596, 1980

Schmid A, Jungbauer Claudia
Fremdstoffexpiration von Mäusen nach parenteraler Belastung mit chlorierten Methanderivaten
Arch Pharmacol 311 (S), Nr. 76, 1980

Schmid A
Radikalbildung organischer Schadstoffe
Der Praktische Tierarzt 9, 801 - 807, 1982 a

Schmid A
Persönliche Mitteilung
München, 1982 b

Schmid A, Beuter W
Metabolische Radikalbildung aus Tetrachloräthylen und ihre Beeinflussung durch Enzyminduktion und -hemmung
Zbl Vet Med A 29, 481 - 488, 1982

Schmid A, Beuter W, Friedrich A
Lipidperoxidation in vivo durch Schwermetalle
Wien tierärztl Moschr, 1982 im Druck

Slater T F
Biochemical studies on liver injury
In: Slater T F (ed)
Biochemical Mechanisms in Liver Injury, pp 1 - 43
New York: Academic Press, 1978

Stacey N H, Priestly B G, Hall R C
Toxicity of halogenated volatile anesthetics in isolated rat hepatocytes
Anesthesiology 48, 17 - 22, 1978

Stefanini M, Herland A, Kosyak E P
Fatal massive necrosis of the liver after repeated exposure to methoxyflurane
Anesthesiology 32, 374 - 378, 1970

Sun A Y
The effect of lipoperoxidation on synaptosomal $(Na^{+}+K^{+})$-ATPase isolated from the cerebral cortex of squirrel monkey
Biochim Biophys Acta 266, 350 - 360, 1972

Sweeney G D
Functional heterogeneity among liver cells: complications for drug toxicity and metabolism
Trends Pharmacol Sci 2, 141 - 144, 1981

Sykes P
Reaktionsmechanismen der organischen Chemie
7. Aufl.
Weinheim: Verlag Chemie, 1976

Takahashi S, Shigematsu A, Furukawa T
Interaction of volatile anesthetics with rat hepatic microsomal cytochrome P-450
Anesthesiology 41, 375 - 379, 1974

Takahashi S, Karashima D, Shigematsu A, Furukawa T
Formaldehyde formation as a metabolite of methoxyflurane
Anaesthesist 26, 135 - 137, 1977

Tappel A L
Lipid peroxidation damage to cell components
Fed Proc 32, 1870 - 1874, 1973

Tappel A L
Measurement of and protection from in vivo lipid peroxidation
In: Pryor W A (ed)
Free Radicals in Biology, Vol. IV, pp 2 - 47
New York: Academic Press, 1980

Tappel A L, Dillard Cora J
In vivo lipid peroxidation: measurement via exhaled pentane and protection by vitamin E
Fed Proc 40, 174 - 178, 1981

Taves D R, Fry B W, Freeman R B, Gillies A J
Toxicity following methoxyflurane anesthesia
II. Fluoride concentration in nephrotoxicity
JAMA 214, 91 - 95, 1970

Terao J, Matsushita S
Thiobarbituric acid reaction of methyl arachidonate monohydroperoxide isomers
Lipids 16, 98 - 101, 1981

Thomason R, Light G, Holaday D A
Methoxyflurane anesthesia: a clinical appraisal
Anesth Analg 41, 225 - 229, 1962

Ullrich V
Mechanism of microsomal monooxygenases and drug toxicity
In: Jollow D J, Kocsis J J, Snyder R, Vainio H (eds)
Biological Reactive Intermediates: Formation, Toxicity and Inactivation, pp 65 - 80
New York, London: Plenum Press, 1977

Van Dyke R A, Chenoweth M B, Van Poznak A
Metabolism of volatile anesthetics
I. Conversion in vivo of several anesthetics to $^{14}CO_2$ and chloride
Biochem Pharmacol 13, 1239 - 1248, 1964

Van Dyke R A, Chenoweth M B
The metabolism of volatile anesthetics
II. In vitro metabolism of methoxyflurane and halothane in rat liver slices and cell fractions
Biochem Pharmacol 14, 603 - 609, 1965

Van Dyke R A
Metabolism of volatile anaesthetics
III. Induction of microsomal dechlorinating and ether-cleaving enzymes
J Pharm Exp Ther 154, 364 - 369, 1966

Van Dyke R A
Metabolism of anesthetic agents: toxic implications
Acta Anesth Scand 25, Suppl 72, 4, abstr c 2, 1981

Van Poznak A
Methoxyflurane and teflurane
In: Chenoweth M B (ed)
Modern Inhalation Anesthetics, pp 77 - 92
Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Vol. 30
(Heffter-Heubner, new series)
Berlin, New York: Springer, 1972

Verspohl E J
Narkotika
In: Ammon H P T
Arzneimittelneben- und Wechselwirkungen, S. 149 - 159
Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 1981

Vladimirov Y A, Olenev V I, Suslova I B, Cheremisina Z P
Lipid peroxidation in mitochondrial membrane
Adv Lipid Res 17, 173 - 249, 1980

Ward G S, Byland B S
Concentrations of methoxyflurane and nitrous oxide
in veterinary operating rooms
Am J Vet Res 43, 36 - 362, 1982

Waskell Lucy, Gonzales J
Dependence of microsomal methoxyflurane o-demethylation
on cytochrome P-450-reductase and the stoichiometry of
fluoride ion and formaldehyde release
Anesth Analg 61, 609 - 613, 1982

Wharton R S, Sievenpiper T S, Mazze R I
Developmental toxicity of methoxyflurane in mice
Anesth Analg 59, 421 - 425, 1980

White Anne E, Stevens W C, Eger E I II, Mazze R I, Hitt B
Enflurane and methoxyflurane metabolism at anesthetic
and at subanesthetic concentrations
Anesth Analg (Cleve) 58, 221 - 224, 1979 a

White Anne E, Takehisa S, Eger E I II, Wolff S, Stevens W C
Sister chromatid exchanges induced by inhaled anesthetics
Anesthesiology 50, 426 - 430, 1979 b

Whitford G M, Taves D R
Fluoride-induced diuresis: renal tissue solute concentra-
tions, functional, hemodynamic, and histologic correlates
in the rat
Anesthesiology 39, 416 - 427, 1973

Wiegand M, Frank H
Lipid peroxidation of liver microsomes: identification
of oxidation products of fatty acids by mass spectrometry
Arch Pharmacol 319 Suppl, R 14, abstr 54, 1982

Wills E D
Effects of lipid peroxidation on membrane-bound enzymes
of the endoplasmatic reticulum
Biochem J 123, 983 - 991, 1971

Willson R L
Free radicals and tissue damage: mechanistic evidence
from radiation studies
In: Slater T F (ed)
Biochemical Mechanisms of Liver Injury, pp 123 - 224
New York: Academic Press, 1978

Willson R L
Hydroxyl radicals and biological damage in vitro:
what relevance in vivo ?
In: Ciba Foundation Symposium 65 (new series)
Oxygen Free Radicals and Tissue Damage
Amsterdam: Excerpta Medica, 1979

Zimmerman H J
Hepatic injury caused by therapeutic agents
In: Becker F F (ed)
The Liver: Normal and Abnormal Functions, pp 225 - 302
New York: Dekker, 1974

Zimmermann R
Radikalbildung im tierischen Organismus und deren pathogenetische Bedeutung
Der Praktische Tierarzt 9, 770 - 778, 1982

LEBENSLAUF

Geburtstag	6. Januar 1956
Geburtsort	Stuttgart
Eltern	Helga Wiedemann, geb. Stahl Adolf Wiedemann, Schreiner
Schulausbildung	1963 - 1966 Schwabschule in Stuttgart (Grundschule) 1966 - 1975 Schickhardt-Gymnasium in Stuttgart Mai 1975 Abitur
Bundeswehr	Juli 1975 - September 1976
Studium	ab Wintersemester 1976/1977 Studium der Veterinärmedizin an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
Staatsexamen	November 1981 in München
Approbation	Januar 1982 in München

Mein sehr herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. A. Schmid für die Überlassung des Themas, sowie für seine wissenschaftliche Anleitung und seine stets freundlich gewährte Unterstützung bei der Durchführung der vorliegenden Arbeit.

Außerdem danke ich Frau M. Kussmaul, Frau B. Ferlings und Herrn Dr. W. Beuter, die mir oftmals wertvolle Hilfe leisteten.